



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

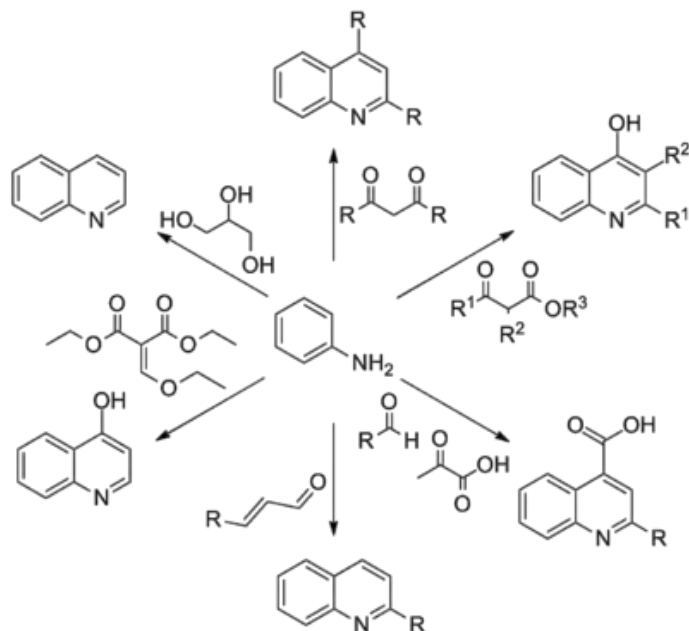
ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟ-ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*«Σχεδιασμός, σύνθεση, φασματοσκοπικός προσδιορισμός και διερεύνηση
βιολογικής δράσης κινολινονών και παραγώγων τους»*

*«Design, synthesis, spectroscopic characterization and biological activity
investigation of novel quinolinone derivatives»*



ΣΤΥΛΙΑΝΗ-ΔΑΝΑΗ ΑΝΤΩΝΑΚΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2019

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κομιώτης Δημήτριος: Καθηγητής Οργανικής Χημείας με έμφαση στη Σύνθεση Βιοδραστικών Μορίων, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Μήτσος Χρήστος: Εργαστηριακό διδακτικό προσωπικό (Ε.ΔΙ.Π), Εργαστήριο Οργανικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Αμούτζιας Γρηγόριος: Επίκουρος Καθηγητής Βιοπληροφορικής στη Γενωμική , Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιο-οργανικής χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Δημήτριου Κομιώτη. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά για την ανάθεση του θέματος, το ενδιαφέρον του αλλά και το χρόνο που διέθεσε για να λύσει οποιοδήποτε πρόβλημα συναντούσα κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Μήτσο Χρήστο για την πολύτιμη βοήθειά του, την υπομονή, τον σεβασμό και την επιμονή του να ξεπεράσουμε κάθε δυσκολία που συναντούσαμε. Ήταν πάντα διαθέσιμος και έτοιμος να με συμβουλευσει και να μου μάθει νέα πράγματα για να εμπλουτίσω τις γνώσεις μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλους τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές του εργαστηρίου, και ιδιαίτερα τον υποψήφιο διδάκτορα Κολλάτο Νικόλαο που δημιούργησαν ένα φιλικό κλίμα συνεργασίας και ήταν πρόθυμοι να επιλύσουν οποιαδήποτε απορία μου.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου που με στηρίζουν σε κάθε μου προσπάθεια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ιοί της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας τύπου 1 (HIV-1), της ηπατίτιδας C (HCV) και της γρίπης τύπου Α αποτελούν ευρέως γνωστές απειλές για την ανθρώπινη υγεία και το εύρος των διαθέσιμων φαρμακευτικών θεραπειών είναι σχετικά περιορισμένο. Οι προαναφερθέντες ιοί, αν και εντελώς διαφορετικοί μεταξύ τους, περιλαμβάνουν κάποια ένζυμα που έχουν ως κοινό γνώρισμα την ανάγκη ύπαρξης ιόντων Mg^{2+} για την εύρυθμη λειτουργία τους. Έχοντας ως γνώμονα τις ιδιότητες σύμπλεξης των 4-υδροξύκινολιν-2-ονών και Ν-άκυλο-υδραζονων με ιόντα Mg^{2+} , στην παρούσα διπλωματική εργασία σχεδιάστηκαν νέα παράγωγα τα οποία συνδυάζουν και τους δύο τύπους ενώσεων. Κατά αυτό τον τρόπο τα νέα παράγωγα μπορούν εν δυνάμει να σχηματίσουν χηλικά σύμπλοκα με δύο ιόντα Mg^{2+} και να δράσουν ως αναστολείς των συγκεκριμένων ιικών ενζύμων. Ακολουθήθηκαν δύο διαφορετικές συνθετικές πορείες ώστε να παραχθούν παράγωγα κινολίνης υποκατεστημένα ή μη στο άζωτο, ενώ το τελικό στάδιο περιλαμβάνει μια απλή αντίδραση με αλδεΐδη, παρέχοντας τη δυνατότητα εισαγωγής διαφόρων υποκαταστατών στο υδραζονο-τμήμα του μορίου. Όλα τα τελικά προϊόντα ταυτοποιήθηκαν μέσω φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και δείγματά τους έχουν σταλεί στο ινστιτούτο REGA στο Βέλγιο για να διερευνηθούν οι πιθανές αντικές ιδιότητές τους.

ABSTRACT

Viruses such as HIV-1, HCV and Influenza A are well known threats for human health and the range of available pharmaceutical agents for their treatment is still limited. Even though the aforementioned viruses have different genetic material, they all share the common requirement for Mg^{+2} ions as cofactors in certain enzymatic activities. Having this requirement in mind and taking into consideration the ability of 4-hydroxyquinolin-2-ones and N-acetylhydrazones to chelate magnesium ions, the current study focused on synthesizing novel derivatives that combine both compound types. Thus, the novel derivatives may potentially form chelates with two magnesium ions resulting in the inhibition of specific ion enzymes. Two different synthetic routes were followed in order to produce both N-substituted and unsubstituted quinoline derivative, whilst a simple reaction using aldehyde in the final step enabled introduction of various groups in the hydrazone moiety of the new molecules. All new compounds were characterized by nuclear magnetic resonance spectroscopy, and their potential antiviral activity will be evaluated in the Rega Institute in Belgium.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	2
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Ιοί.....	8
1.2 Παράγωγα Κινολίνης: Ιδιότητες και βιολογική σημασία.....	10
1.3 Βιολογικές δράσεις <i>N</i> -ακυλο-υδραζονών	13
2.ΣΚΟΠΟΣ	16
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	18
3.1 Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (Thin Layer Chromatography: TLC).....	18
3.2 Χρωματογραφία Στήλης Υψηλής Απόδοσης (High Performance Flash Chromatography: HPFC).....	19
3.3 Σημείο Τήξεως (Melting Point: Tm)	21
3.4 Ανακρυστάλλωση	21
3.5 Επισκόπηση Πειραματικής Πορείας Μη Υποκατεστημένων στο N, Παραγώγων Κινολίνης.....	23
Επισκόπηση Αντιδράσεων	24
Σύνθεση της 2-αιθόξυ-1,3-βενζοξαζιν-4-όνης (1)	25
Σύνθεση του 2-(2-((αιθόξυ καρβόνυλο) αμινο) βενζοϋλο) μηλονικός διμεθυλεστέρας (2a).....	26
Σύνθεση του 4-υδρόξυ-2-οξο-1,2-διϋδοκινολινο-3-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα (2b).....	27
Σύνθεση του 4-υδρόξυ-2-όξο-1,2-διϋδοκινολινο-3-καρβοϋδραζιδίου (3)	28
Σύνθεση του (E)-N'-(3 φθοροβενζυλιδενο)-4-υδρόξυ-2-οξο-1,2-οδιϋδροκινολίνο-3-καρβοϋδραζιδίου (4a)	29
Φάσμα ¹ H –NMR του (4a)	30
Σύνθεση του (E)-N'-(4-φθοροβενζυλιδενο)-4-υδρόξυ-2-οξο-1,2-διϋδροκινολινο -3-καρβοϋδραζιδίου (4b)	31
Φάσμα ¹ H –NMR του (4b).....	32
Σύνθεση του (E)-4-υδρόξυ-N-(4-μεθόξυβενζυλιδενο)-2-οξο-1,2-διϋδροκινολινο -3-καρβοϋδραζιδίου (4c)	33
Φάσμα ¹ H –NMR του (4c)	34

3.6 Επισκόπηση Πειραματικής Πορείας Υποκατεστημένων στο N, Παραγώγων Κινολίνης.....	35
Επισκόπηση Αντιδράσεων	36
Σύνθεση του N-μέθυλο ισατοϊκού ανυδρίτη (6) με ενδιάμεσο προϊόν το 2-((αιθόξυκαρβόνυλο) (μέθυλο) άμινο) βενζοϊκό οξύ (5)	37
Σύνθεση του 4-υδρόξυ-1-μεθυλ-2-οξο-1,2-διϋδροκινολινο-3-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα (7).....	38
Σύνθεση του 4-υδρόξυ-1-μέθυλ-2-οξο-1,2 διϋδροκινολινο-3-καρβοϋδραζιδίου (8)	39
Σύνθεση του (E)-N-(3-φθοροβενζιλιδενο)-4-υδρόξυ-1-μέθυλο-2-οξο-1,2-διϋδροκινολινο-3-καρβοϋδραζιδίου (9b).....	40
Φάσμα ¹ H –NMR του (9a)	41
Σύνθεση του (E)-N-4-φθοροβενζιλιδενο)-4-υδρόξυ-1-μέθυλο-2-οξο-1,2-διϋδροκινολινο-3-καρβοϋδραζιδίου (9b).....	42
Φάσμα ¹ H –NMR του (9b)	43
Σύνθεση του (E)-4-υδρόξυ-N-(4-μεθοξυβενζιλιδενο)-1-μεθυλο-2-οξο-1,2-διϋδροκινολινο-3-καρβοϋδραζιδίου (9c)	44
Φάσμα ¹ H –NMR του (9c)	45
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	46
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	48

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ιοί

Οι ιοί είναι μη κυτταρικοί μολυσματικοί παράγοντες των οποίων η βασική δομή περιλαμβάνει γενετικό υλικό (DNA ή RNA) εγκλεισμένο μέσα σε ένα προστατευτικό πρωτεϊνικό περίβλημα, το καψίδιο. Το γενετικό υλικό τους κωδικοποιεί μόνο τις πρωτεΐνες του καψιδίου και ορισμένα απόλυτα απαραίτητα ένζυμα, συνεπώς στερούνται της δυνατότητας αυτόνομου πολλαπλασιασμού εκτός κάποιου κυττάρου-ξενιστή. Οι παθογόνοι ιοί που προσβάλλουν τα ανθρώπινα κύτταρα μπορούν να προκαλέσουν από ήπια έως πολύ βαριά συμπτώματα ακόμα και να επέλθει θάνατος. Αν και η αποτελεσματικότερη μέθοδος για την αντιμετώπισή τους είναι ο εμβολιασμός, τα απαραίτητα εμβόλια έχουν αναπτυχθεί για λιγιστά είδη τους, ενώ ακόμη και τα διαθέσιμα καθίστανται συχνά αναποτελεσματικά λόγω των συχνών μεταλλάξεων που υφίστανται οι ιοί, επομένως η ανάπτυξη αντιαικών χημειοθεραπευτικών παραγόντων είναι αναγκαία για την προστασία της δημόσιας υγείας. Η πρόοδος στην κατανόηση του κύκλου ζωής των ιών και στον προσδιορισμό της δομής και της λειτουργίας των ιικών πρωτεϊνών έχει συμβάλλει στην ανάπτυξη τέτοιων χημικών ενώσεων τις τελευταίες δεκαετίες. Η πανδημία του «συνδρόμου επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS)», που οφείλεται σε λοίμωξη από τον ιό HIV, ενθάρρυνε την έρευνα σε αυτό τον τομέα και πλέον πολλά αντιαικά φάρμακα, τόσο για τον HIV όσο και για άλλους ιούς, είναι διαθέσιμα.

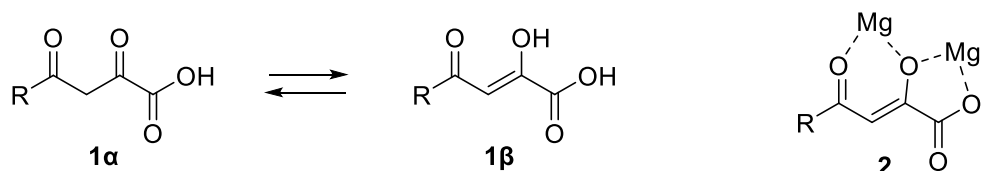
Ο HIV είναι ένας ρετροϊός, δηλαδή το γενετικό του υλικό είναι ένα μονόκλωνο μόριο RNA το οποίο μεταγράφεται αντίστροφα σε δίκλωνο μόριο DNA και στη συνέχεια ενσωματώνεται στο DNA του προσβεβλημένου κυττάρου. Η αντίστροφη μεταγραφή επιτελείται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (HIV RT) και η ενσωμάτωση, από το ένζυμο ιντεγκράση (HIV IN). Ο HIV προσβάλλει τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που φέρουν τη γλυκοπρωτεΐνη CD4 καθιστώντας τελικά τον ανθρώπινο οργανισμό ευπαθή σε μη θανατηφόρες υπό φυσιολογικές συνθήκες ασθένειες. Η καθυστέρηση στην ανάπτυξη εμβολίου για τον HIV σε συνδυασμό με την εμφάνιση ανθεκτικών, στα υπάρχοντα φάρμακα, στελεχών του καθιστά αναγκαία την διαρκή ανάπτυξη νέων αντιαικών μορίων.

Ένας άλλος ιός για τον οποίο δεν υπάρχει προς το παρόν εμβόλιο είναι ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV). Το γενετικό υλικό του HCV είναι ένα μονόκλωνο μόριο (+)-RNA, από το οποίο μεταφράζονται απευθείας οι πρωτεΐνες του ιού, ενώ η αντιγραφή

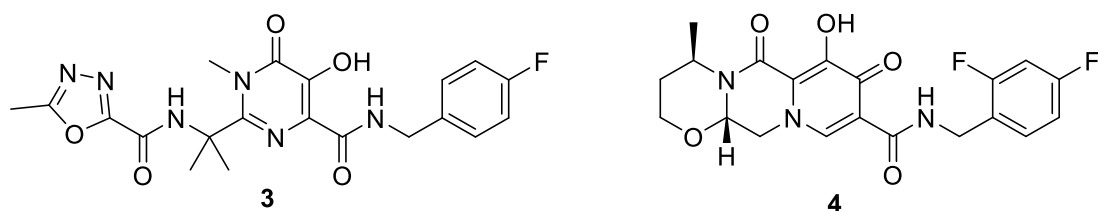
του πραγματοποιείται από την RNA πολυμεράση του HCV (NS5B). Η μόλυνση από τον HCV συνήθως οδηγεί σε χρόνια λοίμωξη από την οποία υπολογίζεται ότι πάσχει το 1% του παγκόσμιου πληθυσμού. Η χρόνια ηπατίτιδα C αποτελεί συνήθη αιτία της κίρρωσης ή του καρκίνου του ήπατος και σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας προκάλεσε περίπου 400.000 θανάτους το 2015.

Στην περίπτωση του ιού της γρίπης υπάρχει διαθέσιμο εμβόλιο το οποίο όμως πρέπει να ανανεώνεται συχνά λόγω των μεταλλάξεων των επιφανειακών ιικών πρωτεϊνών. Η εμφάνιση εξαιρετικά λοιμογόνων στελεχών του ιού γρίπης Α μπορεί να προκαλέσει πανδημίες γρίπης, όπως η «ισπανική» του 1918, των «πτηνών» (1997) και των «χοίρων» (2009) [25]. Τα υπάρχοντα φάρμακα για τη γρίπη περιλαμβάνουν τους αναστολείς των διαύλων πρωτονίων M2 (αμανταδίνη και ριμανταδίνη) και νευραμινιδάσης (ζαναμιβίρη και οσελταμιβίρη). Ωστόσο, η εξάπλωση στελεχών ανθεκτικών τόσο στα αδαμαντάνια όσο και στην οσελταμιβίρη [26] επιβάλλει την εξέλιξη νέων θεραπευτικών ενώσεων. Ο ιός της γρίπης έχει ως γενετικό υλικό ένα μονόκλωνο μόριο (-)RNA, το οποίο πρέπει να μεταγραφεί στο συμπληρωματικό του μονόκλωνο RNA προκειμένου να συντεθούν οι ικές πρωτεΐνες. Σε αυτή τη διαδικασία είναι αναγκαία η απόσπαση τμημάτων RNA (cap snatching) από το κυτταρικό RNA, η οποία επιτυγχάνεται μέσω της λειτουργίας ενδονουκλεάσης που επιτελεί η υπομονάδα PA της RNA πολυμεράσης του ιού.

Παρά τις διαφορές στο γενετικό υλικό και τον κύκλο ζωής τους, οι παραπάνω ιοί έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό συγκεκριμένα ένζυμα που χρειάζονται ιόντα μαγνησίου (Mg^{2+}) για τη λειτουργία τους [1]. Τα ένζυμα αυτά είναι η ιντεγκράση του HIV, η λειτουργία ριβονουκλεάσης (RNase H) της αντίστροφης μεταγραφάσης του HIV, η RNA πολυμεράση του HCV, και η λειτουργία ενδονουκλεάσης της RNA πολυμεράσης του ιού της γρίπης. Στα ενεργά κέντρα αυτών των ενζύμων είναι απαραίτητη η διαμεσολάβηση δύο ιόντων Mg^{2+} προκειμένου να επιτευχθεί η καταλυτική τους δράση στο αντίστοιχο υπόστρωμα. Ως συνέπεια αυτού του κοινού χαρακτηριστικού, και στα τέσσερα ένζυμα, δρουν ανασταλτικά τα παράγωγα α,γ-δικετοοξέων (DKAs) του γενικού τύπου **1a** (η **1b** είναι η ταυτομερής ενολική μορφή τους), τα οποία διαθέτουν άτομα οξυγόνου σε κατάλληλες θέσεις ώστε να συνδεθούν με τα σύμπλοκα ενζύμου- Mg^{2+} , όπως φαίνεται στη δομή **2**.

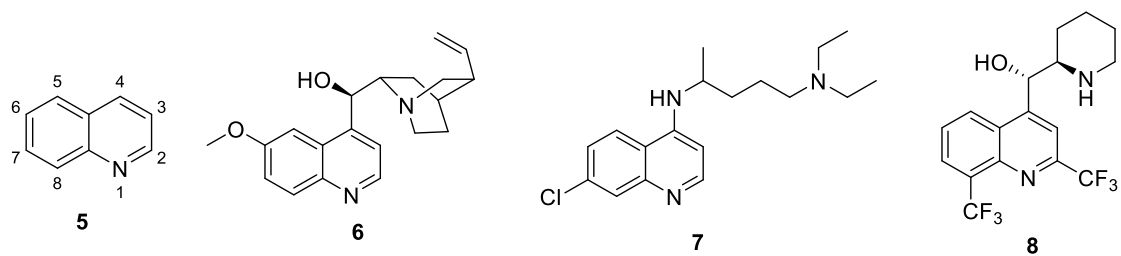


Τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί μεγάλη έμφαση στην έρευνα για την εξεύρεση οργανικών μορίων τα οποία θα φέρουν άτομα-δότες (οξυγόνο ή άζωτο) σε κατάλληλες θέσεις ώστε να είναι εφικτή η σύμπλεξή τους με ιόντα μαγνησίου. Αυτές οι προσπάθειες κατέληξαν στην ανάπτυξη της τελευταίας γενιάς αντι-HIV παραγόντων, όπως είναι η ραλτεγκραβίρη (**3**) και η ντολουτεγκραβίρη (**4**), οι οποίοι αναστέλλουν τη δράση της ιντεγκράσης. Προς το παρόν δεν υπάρχει κάποιο εγκεκριμένο φάρμακο με δράση έναντι κάποιου από τα υπόλοιπα ένζυμα που αναφέρθηκαν.

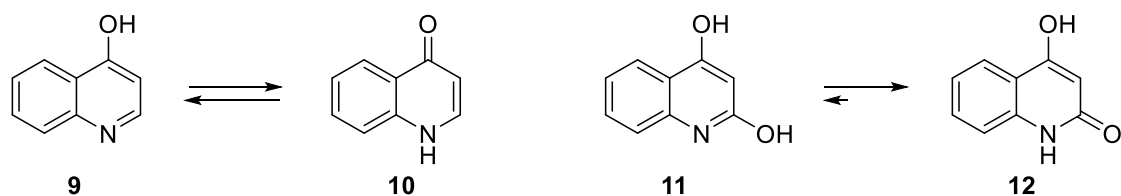


1.2 Παράγωγα Κινολίνης: Ιδιότητες και βιολογική σημασία

Η κινολίνη (**5**) είναι μια ετεροκυκλική ένωση με βασικές ιδιότητες λόγω της παρουσίας του ασύζευκτου ζεύγους ηλεκτρονίων στο άτομο αζώτου. Αν και η ίδια η κινολίνη δεν παρουσιάζει αξιοσημείωτες βιολογικές δράσεις, πλήθος φυσικών προϊόντων (κυρίως αλκαλοειδών) και ενώσεων με σημαντικές φαρμακευτικές εφαρμογές εμπεριέχουν αυτό το ετεροκυκλικό σύστημα [2]. Το πλέον γνωστό παράδειγμα αποτελεί η κινίνη (**6**), η πρώτη φαρμακευτική ουσία που χρησιμοποιήθηκε για την αντιμετώπιση της ελονοσίας, η οποία απομονώθηκε από φυτά του γένους *Cinchona*. Συνθετικά παράγωγα κινολίνης, όπως είναι η χλωροκίνη (**7**) και η μεφλοκίνη (**8**), χρησιμοποιούνται επίσης ευρέως στην φαρμακευτική αγωγή της ελονοσίας [3].

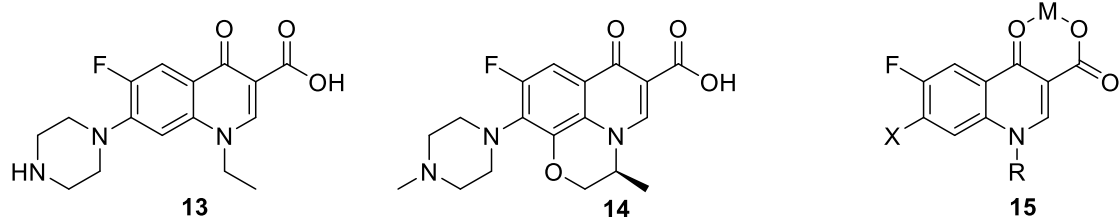


Μία σημαντική υποκατηγορία κινολινών συγκροτούν τα παράγωγα με υδροξύ ομάδα στη θέση 4 ή και στη θέση 2 του του δικυκλικού συστήματος. Οι 4-υδροξυκινολίνες (**9**) μπορούν να βρεθούν και στην ταυτομερή 4-οξο μορφή της 4-κινολόνης (**10**), με την κυρίαρχη μορφή να καθορίζεται από την παρουσία άλλων υποκαταστατών στο μόριο, ενώ στις 2,4-διυδροξυκινολίνες (**11**) σταθερότερη είναι η ταυτομερής μορφή της 4-υδροξυκινολιν-2-όνης (**12**) [4].

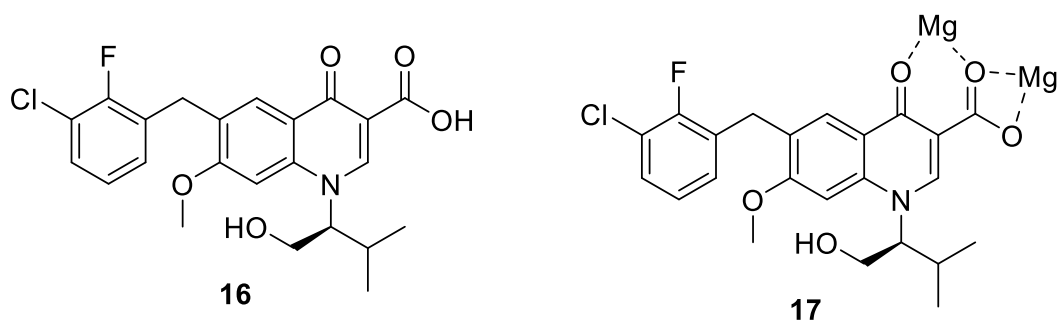


Οι σημαντικότερες ενώσεις του τύπου **10** είναι τα μη φυσικά αντιβακτηριακά που είναι γνωστά ως «κινολόνες» τα οποία βρίσκονται υποχρεωτικά στην 4-όξο μορφή, λόγω της παρουσίας υποκαταστάτη στο N-1, και φέρουν μια καρβοξυλική ομάδα στη θέση 3, ενώ στην πλειοψηφία τους έχουν ένα άτομο φθορίου στη θέση 6. Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα είναι η κινολόνη δεύτερης γενιάς σιπροφλοξασίνη (**13**) και η τρίτης γενιάς νορφλοξασίνη (**14**). Ο μηχανισμός δράσης των κινολονών βασίζεται στο σχηματισμό τριαδικών συμπλόκων με το DNA και τις τύπου II τοποϊσομεράσες DNA γυράση και τοποϊσομεράση IV του βακτηρίου [5]. Λόγω της γειτνίασης του καρβονυλικού οξυγόνου και της καρβοξυλικής ομάδας στις θέσεις 3 και 4 αντίστοιχα, τα αντιβακτηριακά κινολόνες μπορούν να συμπλεχθούν με δισθενή ή τρισθενή μεταλλικά ιόντα (**15**) [6], ιδιότητα στην οποία αποδίδεται η περιορισμένη απορρόφηση και αποτελεσματικότητά τους όταν λαμβάνονται παράλληλα με σκευάσματα όπως είναι τα αντιόξινα που περιέχουν ιόντα Al^{3+} και Mg^{2+} [7]. Ωστόσο έχει διατυπωθεί η άποψη ότι τα ιόντα Mg^{2+} είναι απαραίτητα για τη σύνδεση των κινολονών με το βακτηριακό DNA και την επακόλουθη αναστολή της δράσης της

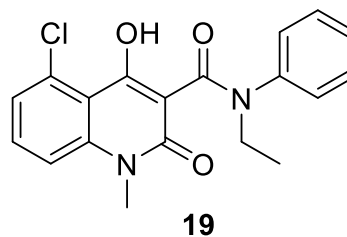
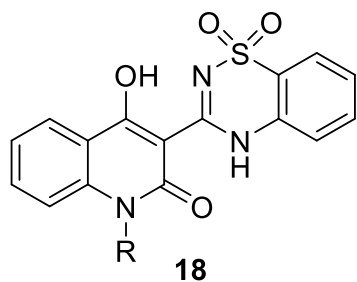
DNA γυράσης [8]. Επιπλέον η διασύνδεση μιας κινολόνης με την τοποϊσομεράση IV μέσω ενός ιόντος Mg^{2+} υποστηρίζεται από κρυσταλλογραφικά δεδομένα [9].



Μια σημαντική εφαρμογή αυτής της συμπλεκτικής ικανότητας των 4-οξοκινολινο-3-καρβοξυλικών οξέων συναντάμε στην περίπτωση της ελβιτεγκραβίρης (**16**), ενός αναστολέα της ιντεγκράσης του HIV-1, που δρα με παρόμοιο τρόπο με τους προαναφερθέντες αναστολείς ραλτεγκραβίρη και ντολουτεγκαραβίρη. Αν και στη **16** τα ετεροάτομα δότες ηλεκτρονίων έχουν διαφορετική διάταξη σε σχέση με τους δύο άλλους αναστολείς, θεωρείται ότι η απαραίτητη σύμπλεξη με δύο ιόντα μαγνησίου είναι δυνατή με τον τρόπο που απεικονίζεται στον τύπο **17** [10].

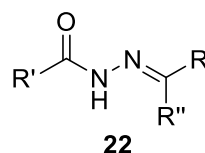
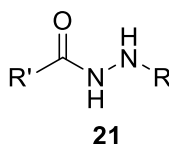
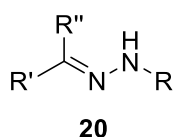


Ιδιαίτερο φαρμακευτικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν και τα παράγωγα της 4-υδροξυκινολιν-2-όνης όπου η υποκατάσταση στη θέση 3 με βενζοθειαδιάζινο ομάδες (**18**) οδηγεί σε ενώσεις με ανασταλτική δράση έναντι της NS5B RNA πολυμεράσης του ιού της ηπατίτιδας C [11]. Επιπλέον η εισαγωγή καρβοξάμιδο ομάδων στην ίδια θέση τους προσδίδει ανοσορυθμιστική δράση, όπως στην περίπτωση του laquinimod (**19**), το οποίο βρίσκεται στο στάδιο κλινικών μελετών για τη θεραπεία της πολλαπλής σκλήρυνσης [12]. Επιπλέον παράγωγα με 3-άκυλο ομάδες στη θέση 3 σχηματίζουν χηλικά σύμπλοκα με μεταλλικά ιόντα [13], κατ' αναλογία με τα προαναφερθέντα 4-οξοκινολινο-3-καρβοξυλικά οξέα.

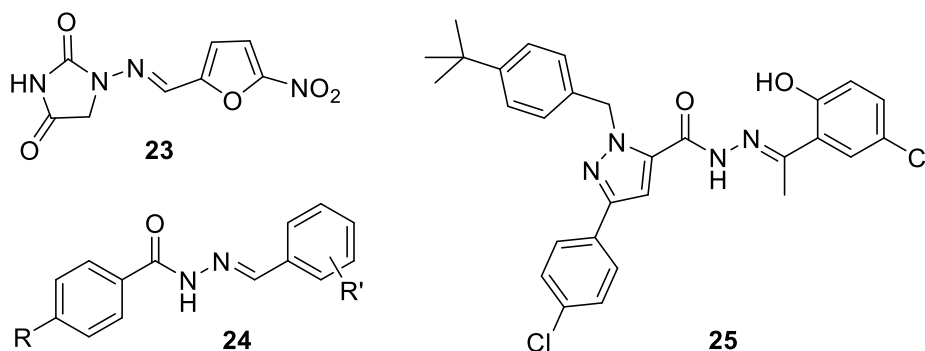


1.3 Βιολογικές δράσεις *N*-ακυλο-υδραζονών

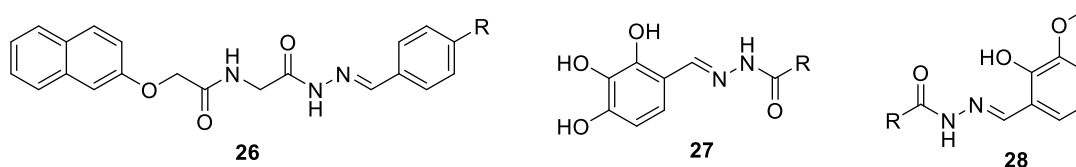
Οι υδραζόνες είναι οργανικές ενώσεις με δομικό χαρακτηριστικό το τμήμα C=N-N (γενικός τύπος **20**) και παρασκευάζονται μέσω αντιδράσεων συμπύκνωσης υδραζινών με αλδεΐδες ή κετόνες. Ποικίλες βιολογικές δράσεις, όπως είναι αναλγητική, αντιεπιληπτική, αντιυπερτασική, αντιαρκτική, αντιμικροβιακή κ.α., έχει αναφερθεί για ενώσεις αυτής της κατηγορίας [14]. Αντίστοιχα τα υδραζίδια (γενικός τύπος **21**) παράγονται από τη συμπύκνωση υδραζινών με καρβοξυλικά οξέα και αποτελούν επίσης ενώσεις με ευρύ φάσμα βιολογικών ιδιοτήτων [15]. Οι χαρακτηριστικές ομάδες **20** και **21** συνδυάζονται μέσω αντιδράσεων υδραζιδίων με καρβονυλικές ενώσεις οπότε προκύπτουν οι *N*-ακυλο-υδραζόνες (**22**), ενώσεις με εφαρμογές στη φαρμακολογία [16], στην οργανική σύνθεση [17], αλλά και στην επιστήμη υλικών χάρις στην ικανότητα σύμπλεξής τους με μεταλλικά ιόντα [18].



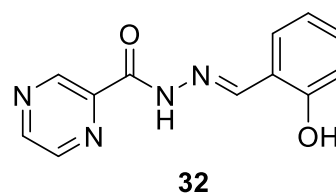
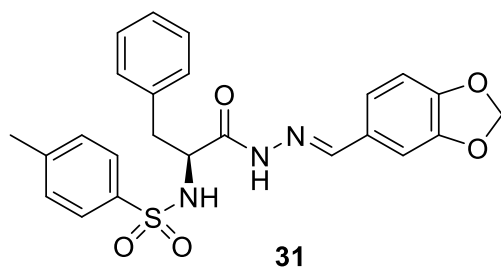
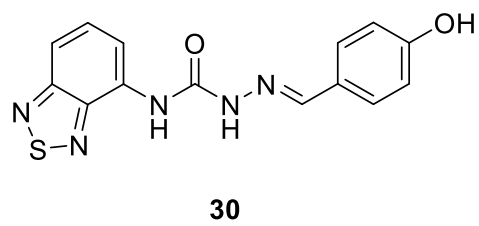
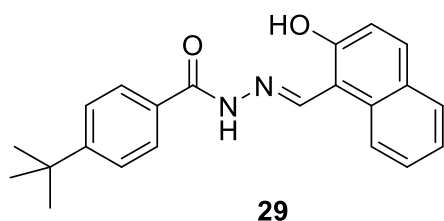
Μεγάλος αριθμός παραγώγων *N*-ακυλοϋδραζόνης επιδεικνύουν αντιμικροβιακή δράση [19], με πιο γνωστό το εγκεκριμένο αντιβακτηριακό φουραντοΐνη (**23**) [20]. Επιπρόσθετα ενώσεις του τύπου **24** έδειξαν ανθελνοσιακή δράση [21], ενώ μια σειρά πυράζολο ενώσεων, με πιο δραστική την **25**, προάγουν την απόπτωση καρκινικών πνευμονικών κυττάρων [22].



Στο πεδίο της αντιικής έρευνας οι N-ακυλοϋδραζόνες έχουν προσελκύσει αρκετό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια. Παράγωγα του υδραζιδίου της γλυκίνης (**26**) έδειξαν δράση εναντίον του ιού ανοσοανεπάρκειας του πιθήκου [23], ενώ οι τριυδροξυφαινυλο-N-ακυλοϋδραζόνες **27** αναστέλλουν την πρωτεάση 3C του ιού Κοξάκι Β3 [24]. Η ικανότητα σύμπλεξης των N-ακυλοϋδραζονών με μεταλλικά ιόντα αξιοποιήθηκε στην περίπτωση του αναστολέα **28** (R = 3,4,5-τριυδροξυφαινυλο) της ενδονουκλεάσης PA του ιού της γρίπης [25] και στα σύμπλοκα της **28** (R = 2-υδροξυφαινυλο) με ιόντα Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} και Zn^{2+} , τα οποία έδειξαν δράση εναντίον DNA ιών όπως ο απλός ερπητοϊός (HSV-1 και HSV-2) και ο ιός της δαμαλίτιδας [26].

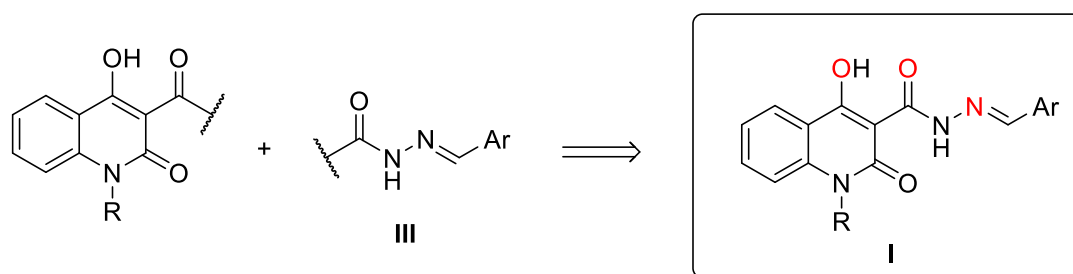


Ενώσεις που περιλαμβάνουν τη δομή της N-ακυλοϋδραζόνης έχουν δείξει διάφορες δράσεις κατά του ιού HIV-1. Η **29** αποσταθεροποιεί τη διμερή δομή της αντίστροφης μεταγραφάσης του ιού [27] αναστέλλοντας κατά αυτό τον τρόπο τόσο τη λειτουργία ριβονουκλεάσης H, όσο και αυτή της DNA πολυμεράσης [28]. Η ένωση **30** παρεμποδίζει την είσοδο του HIV-1 στα CD4 κύτταρα [29], ενώ παράγωγα όπως το **31** στοχεύουν στην πρωτεΐνη του ιικού καψιδίου [30]. Τέλος, N-ακυλοϋδραζόνες όπως η **32** αναστέλλουν την ιντεγκράση του HIV-1 παρεμποδίζοντας την αλληλεπίδρασή της με την πυρηνική κυτταρική πρωτεΐνη LEDGF/p75 [31].



2.ΣΚΟΠΟΣ

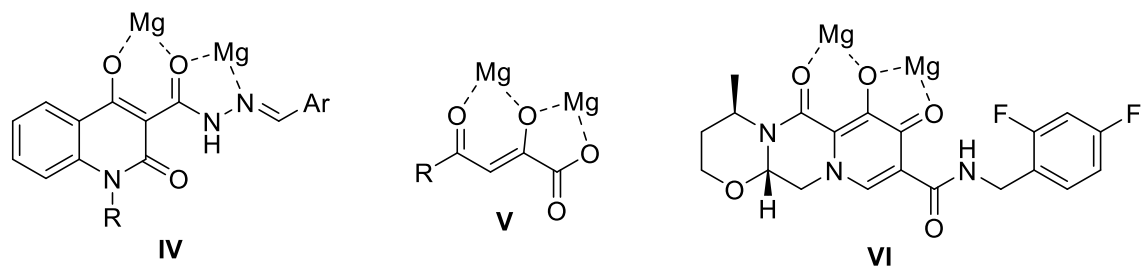
Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο σχεδιασμός και η σύνθεση νέων ετεροκυκλικών μορίων με αντική δράση. Ως συνθετικός στόχος τέθηκαν τα παράγωγα 4-υδροξυκινολιν-2-όνης του γενικού τύπου **I**, όπου R είναι υδρογόνο ή κάποιο αλκύλιο και Ar ένας υποκατεστημένος αρωματικός δακτύλιος. Το σκεπτικό πίσω από τη στόχευση αυτών των ενώσεων είναι να συνδυαστούν σε ένα μόριο δύο τμήματα που να διαθέτουν την ικανότητα σχηματισμού χηλικών συμπλόκων με μεταλλικά ιόντα, και συγκεκριμένα μια 3-άκυλο-4-υδροξυκινολιν-2-όνη **II** με ένα N-ακυλοϋδράζονο τμήμα **III**.



II

Τα μόρια **I** αναμένουμε να μπορούν να συνδεθούν με δύο μεταλλικά ιόντα (όπως του Mg^{2+}), μέσω των ατόμων οξυγόνου της 4-OH ομάδας και του καρβονυλίου στη θέση 3 και επιπλέον μέσω του ιμινικού αζώτου, ώστε να αποτελέσουν δυνητικά αναστολείς ιικών ενζύμων, τα οποία χρειάζονται ιόντα μαγνησίου για την καταλυτική δράση τους. Οι βιολογικοί στόχοι των παραγώγων **I** θα είναι τα ένζυμα που αναφέρθηκαν στην εισαγωγή, δηλαδή η ιντεγκράση και η ριβονουκλεάση H του HIV-1, η RNA πολυμεράση του HCV και η ενδονουκλεάση του ιού της γρίπης. Ο προσδοκώμενος τρόπος σύνδεσης με τα ιόντα μαγνησίου, που απεικονίζεται στη δομή **IV**, είναι παρόμοιος με αυτόν των γνωστών αναστολέων δικετοκαρβοξυλικού οξέος

(V) των παραπάνω ενζύμων ή του αναστολέα ντολουτεγκραβίρη της HIV-1 ιντεγκράσης (VI).



Η δομή των νέων ενώσεων θα επιβεβαιωθεί μέσω φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου και άνθρακα-13. Η βιολογική αποτίμηση των νέων μορίων θα έχει ως κύριο στόχο τον προσδιορισμό πιθανής δράσης έναντι των ιών της γρίπης A, του HIV-1 και της ηπατίτιδας C. Λόγω των ποικίλων αντιακτικών ιδιοτήτων που επιδεικνύουν τα παράγωγα N-ακυλοϋδραζόνης, θα διερευνηθεί και η πιθανή δράση των ενώσεων I έναντι ευρέος φάσματος ιών όπως είναι ο απλός ερπητοϊός, ο Κοξάκι, ο ιός της δαμαλίτιδας κ.α.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

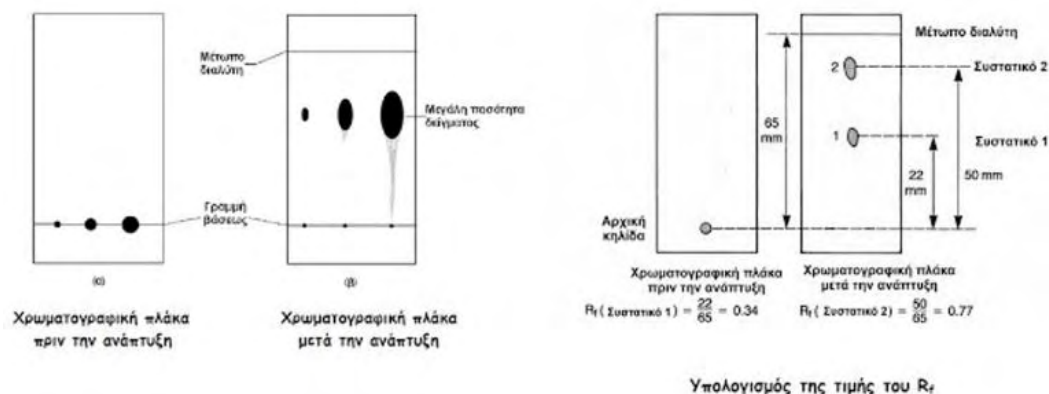
Κατά τη διάρκεια των πειραματικών μελετών χρησιμοποιήθηκαν διάφορες μέθοδοι ταυτοποίησης ή/και καθαρισμού των εκάστοτε νεοσυντιθέμενων ενώσεων. Παρακάτω δίνεται η αρχή μεθόδου της κάθε μίας από αυτές που χρησιμοποιήθηκαν.

3.1 Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (Thin Layer Chromatography: TLC)

Είναι μια μέθοδος ταυτοποίησης και διαχωρισμού οργανικών ενώσεων η οποία βασίζεται στην κατανομή των ουσιών μεταξύ στατικής και κινητής φάσης, ανάλογα με την πολικότητά τους. Στην επίπεδη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας η στατική φάση είναι συνήθως διοξείδιο του πυριτίου (silica gel), τριοξείδιο του αργιλίου (alumina), κυτταρίνη σε σκόνη, ακόμη και ρητίνες. Αυτά είναι ανεμεμιγμένα με μικρή ποσότητα γύψου και επιστρωμένα κατάλληλα σε γυαλί, φύλλα πλαστικού ή αλουμινίου και αποτελούν τον φορέα επίστρωσης. Ως κινητή φάση χρησιμοποιείται οργανικός διαλύτης ή σύστημα διαλυτών (διαλύτες ανάπτυξης) οι οποίοι επιλέγονται ανάλογα με την πολικότητα του συστήματος καθώς ο διαχωρισμός των ουσιών βασίζεται στον μηχανισμό της προσρόφησης.

Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από ένα υάλινο κυλινδρικό δοχείο, με διαλύτη στοιβάδας 0.5-1 εκατοστά, το οποίο διαθέτει εσωτερικά των τοιχωμάτων του διηθητικό χαρτί ώστε να επιτευχθεί κεκορεσμένη ατμόσφαιρα από τον διαλύτη ανάπτυξης καθώς και καπάκι για να μην μεταβάλλονται οι ατμοί στο εσωτερικό του δοχείου. Σε ένα πλακίδιο σημειώνεται μία λεπτή γραμμή λίγα εκατοστά από τη βάση του καθώς και δύο ή και περισσότερες κουκίδες στις οποίες τοποθετούνται οι κηλίδες (spot) των προς διαχωρισμό ουσιών. Η τοποθέτηση του δείγματος πάνω στο πλακίδιο γίνεται με τριχοειδές σωληνάκι σε μορφή κηλίδας. Οι κηλίδες απέχουν μεταξύ τους 1-2cm και εφόσον τοποθετηθούν ομοιόμορφα αφήνονται να στεγνώσουν σε ρεύμα αέρα είτε στεγνώνονται με θερμό αέρα στους 400°C. Στη συνέχεια το πλακίδιο τοποθετείται στο δοχείο που περιέχει τον διαλύτη ανάπτυξης ο οποίος ανεβαίνει με αργό ρυθμό λόγω τριχοειδών φαινομένων. Τέλος, το πλακίδιο απομακρύνεται από το δοχείο όταν το μέτωπο του διαλύτη φτάσει 1-2cm από την κορυφή του και σημειώνεται με μολύβι.

Για τον προσδιορισμό των θέσεων των κηλίδων αφήνουμε το πλακίδιο να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου και «εμφανίζουμε» σε υπεριώδη ακτινοβολία όπου οι κηλίδες φθορίζουν.



Εικόνα 1: Αναπαράσταση πλακιδίου TLC και υπολογισμός R_f

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για να ελέγξουμε την πορεία των αντιδράσεων καθώς και την καθαρότητα των προϊόντων έχοντας ως μάρτυρα τα αντιδρώντα που χρησιμοποιούνται στην εκάστοτε αντίδραση. Ο παράγοντας επιβράδυνσης R_f ορίζεται ως ο λόγος της απόστασης που διένυσε η ουσία προς την απόσταση που κινήθηκε ο διαλύτης (μέτωπο του διαλύτη) και η τιμή του R_f είναι χαρακτηριστική για τις ουσίες.

Υπάρχει άμεση συσχέτιση της απόστασης που διένυσε η ουσία με την πολικότητά της. Όσο πιο πολική είναι η ουσία τόσο περισσότερο προσροφάται στην στατική φάση και εμφανίζεται χαμηλότερα εν αντιθέσει με τις λιγότερο πολικές οι οποίες διανύουν μεγαλύτερη απόσταση και φτάνουν κοντά στο μέτωπο του διαλύτη

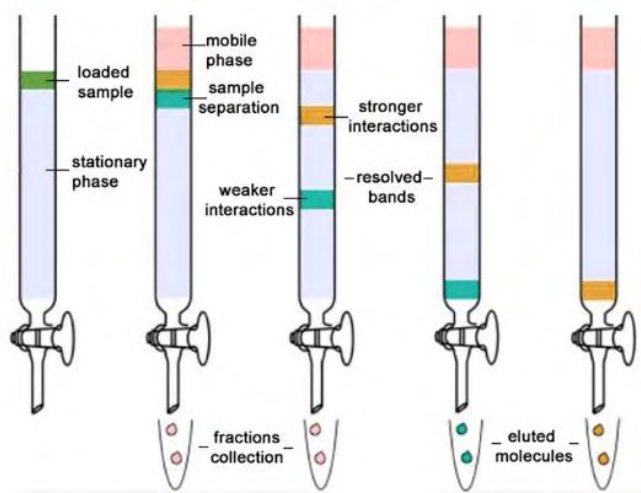
3.2 Χρωματογραφία Στήλης Υψηλής Απόδοσης (High Performance Flash Chromatography: HPFC)

Η χρωματογραφία στήλης είναι μια αξιόπιστη και εύκολη μέθοδος καθαρισμού ουσιών και διαχωρισμού μιγμάτων. Οι ενώσεις διαχωρίζονται με τον ίδιο μηχανισμό όπως και στην χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, ωστόσο λαμβάνουν χώρα διαφορετικές διαμοριακές δυνάμεις μεταξύ των συστατικών, την κινητή και την στατική φάση.

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν ποικίλα προσροφητικά υλικά για την πλήρωση της στήλης αλλά προτιμάται η silica gel η οποία είναι πολύ πολική και χρησιμοποιείται πιο συχνά στην οργανική χημεία. Στην προκειμένη, ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε silica gel και ως κινητή φάση μίγμα διαλυτών.

Σε μία υάλινη στήλη με επιθυμητό ύψος και διάμετρο ετοιμάστηκε το εναιώρημα του διαλύτη με την silica και το οποίο τοποθετείται με τέτοιο τρόπο μέσα στη στήλη ώστε να είναι κατανεμημένο ομοιόμορφα κατά μήκος του σωλήνα και η επιφάνειά του

να είναι όσο το δυνατόν πιο λεία. Στη συνέχεια αφήνεται ο διαλύτης να περάσει με τη βοήθεια αέρα υπό πίεση (flash chromatography) προσέχοντας πάντα να μένει μία στοιβάδα διαλύτη στην επιφάνεια για να μην στεγνώσει η silica. Το δείγμα, το οποίο έχει διαλυθεί σε κατάλληλο διαλύτη, τοποθετήθηκε στην κορυφή της στήλης και το αφέθηκε να αλληλοεπιδράσει με αυτή. Τέλος, προστέθηκε το μίγμα διαλυτών, το οποίο λειτουργεί ως κινητή φάση, και αφέθηκε να εκλουσθεί με την βοήθεια εισαγωγής αέρα υπό πίεση. Κατά τη διάρκεια της έκλουσης του διαλύτη συλλέχθηκαν δείγματα (~1 ml) σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Εφόσον έγινε ταυτοποίηση με TLC, συλλέχθηκαν, απομονώθηκαν και συμπυκνώθηκαν τα δείγματα με το καθαρισμένο προϊόν. Σε αυτή τη μορφή της χρωματογραφίας η στατική φάση, η οποία είναι πολύ πολική, σχηματίζει ισχυρούς δεσμούς με τις πολικές ενώσεις του μίγματος ενώ τα λιγότερο πολικά συστατικά δεν συγκρατούνται ισχυρά στην silica και εκλούνται πρώτα .



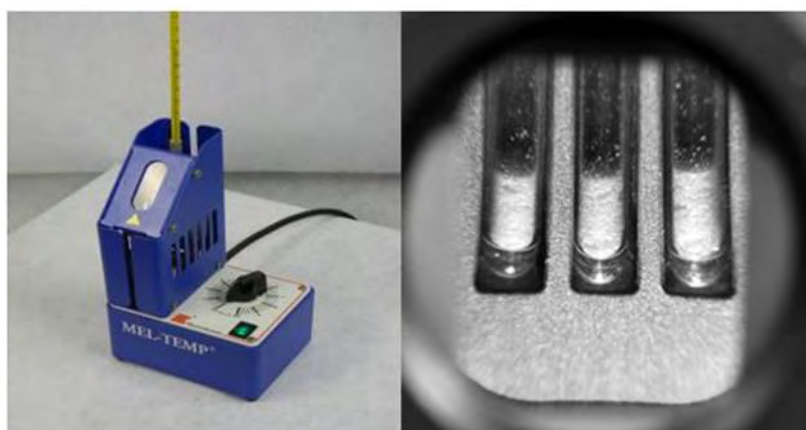
Εικόνα 2:Χρωματογραφία Στήλης-Παραλαβή κλασμάτων

Υπάρχει άμεση συσχέτιση των κλασμάτων, που περιέχουν τα δείγματα , με την εικόνα ενός TLC καθώς οι ουσίες που εκλούνται πρώτες(λιγότερο πολικές) εμφανίζονται κοντά στο μέτωπο του διαλύτη, ενώ αυτές που εκλούνται τελευταίες (πο πολικές) εμφανίζονται κοντά στη βάση του πλακιδίου. Για να γίνει σωστός διαχωρισμός των ουσιών και κατά συνέπεια καθαρισμός του μίγματος πρέπει ο παράγοντας επιβράδυνσης R_f να βρίσκεται μεταξύ 0.2-0.5 για να έχουμε βέλτιστη απόδοση της τεχνικής.

3.3 Σημείο Τήξεως (Melting Point: T_m)

Η μέτρηση του σημείου τήξεως είναι μια χαρακτηριστική φυσικοχημική μέθοδος χαρακτηρισμού και ταυτοποίησης μίας ένωσης. Για κάθε χημική ένωση αντιστοιχεί και μία τιμή στην κλίμακα κελσίου στην οποία η ένωση τήκεται και έχει επιτρεπτό εύρος 1-2°C. Όσο μεγαλύτερο είναι το εύρος της τιμής αυτής τόσες περισσότερες είναι οι πιθανότητες να υπάρχουν προσμίξεις στην αρχική ένωση.

Σε τριχοειδή σωληνάκια τοποθετούμε μικρή ποσότητα του στερεού αφού πρώτα το έχουμε κονιοποιήσει με το γουδί και το αφήνουμε από κάποιο ύψος αρκετές φορές μέχρι να πακεταριστεί σωστά χωρίς να περικλείει αέρα. Στη συνέχεια τοποθετούμε τα σωληνάκια σε ειδική συσκευή η οποία έχει ρυθμιστή θερμοκρασίας και θερμομέτρο υδραργύρου για την παρατήρηση της μεταβολής της θερμοκρασίας. Η έναρξη της μέτρησης του σημείου τήξεως γίνεται από την στιγμή που θα σχηματιστεί η πρώτη σταγόνα μέχρι τη ρευστοποίηση όλου του στερεού όπου σημαίνεται και το τέλος της μέτρησης και λαμβάνεται το εύρος.



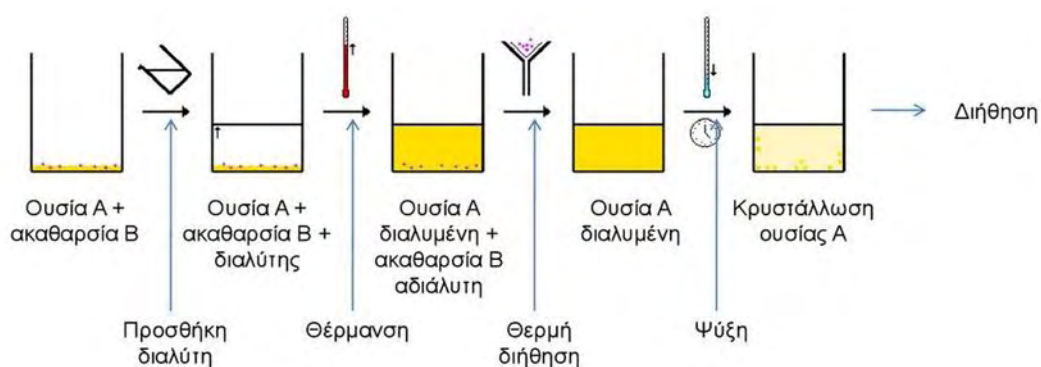
Εικόνα 3: Συσκευή μέτρησης σημείου τήξεως και απεικόνιση δειγμάτων στη συσκευή

3.4 Ανακρυστάλλωση

Η ανακρυστάλλωση είναι μια μέθοδος καθαρισμού μίας ουσίας που βρίσκεται σε στερεή μορφή. Για να γίνει σωστά ο καθαρισμός της ουσίας θα πρέπει να επιλεγθεί κατάλληλος διαλύτης ο οποίος θα διαλύει εν θερμώ την ουσία ενώ οι πιθανές προσμίξεις θα παραμένουν αδιάλυτες. Σε σφαιρική φιάλη τοποθετούμε την ουσία, προσθέτουμε μικρή ποσότητα διαλύτη και θερμαίνουμε σε ελαιόλουτρο. Ο όγκος του διαλύτη που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι τέτοιος ώστε το διάλυμα που θα σχηματισθεί να είναι κορεσμένο.

Μόλις επιτευχθεί η διάλυση γίνεται διήθηση εν θερμώ σε υάλινο χωνί με πτυχωτό ηθμό το οποίο βρίσκεται πάνω από μια κωνική φιάλη. Στη συνέχεια το θερμό διάλυμα

αφήνεται να ψυχθεί αργά σε θερμοκρασία δωματίου για να κρυσταλλώσει, ενώ είναι σημαντικό να μην ψυχθεί απότομα καθώς κατά την κρυστάλλωση θα παγιδευτούν εκ νέου προσμίξεις και θα ακυρωθεί όλη η διαδικασία καθαρισμού. Τέλος οι κρύσταλλοι παραλαμβάνονται και αφήνονται να στεγνώσουν σε ξηραντήρα κενού.



Εικόνα 4: Βήματα ανακρυστάλλωσης

3.5 Επισκόπηση Πειραματικής Πορείας Μη Υποκατεστημένων στο N, Παραγώγων Κινολίνης

Στο πρώτο μέρος των αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της **2-αιθόξυ-1,3-βενζοξαζιν-4-όνης (1)**, παράγωγο το οποίο αποτέλεσε την πρώτη ύλη για τις περαιτέρω αντιδράσεις. Η συνθετική πορεία που χρησιμοποιήθηκε είναι γνωστή στη βιβλιογραφία. Χρησιμοποιήθηκαν 4 ισοδύναμα χλωρομυρμηγκικού αιθυλεστέρα (ClCO_2Et) σε 1 ισοδύναμο ανθρανιλικού οξέος (anthranilic acid) με τη χρήση άνυδρης πυριδίνης ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$) ως διαλύτη.

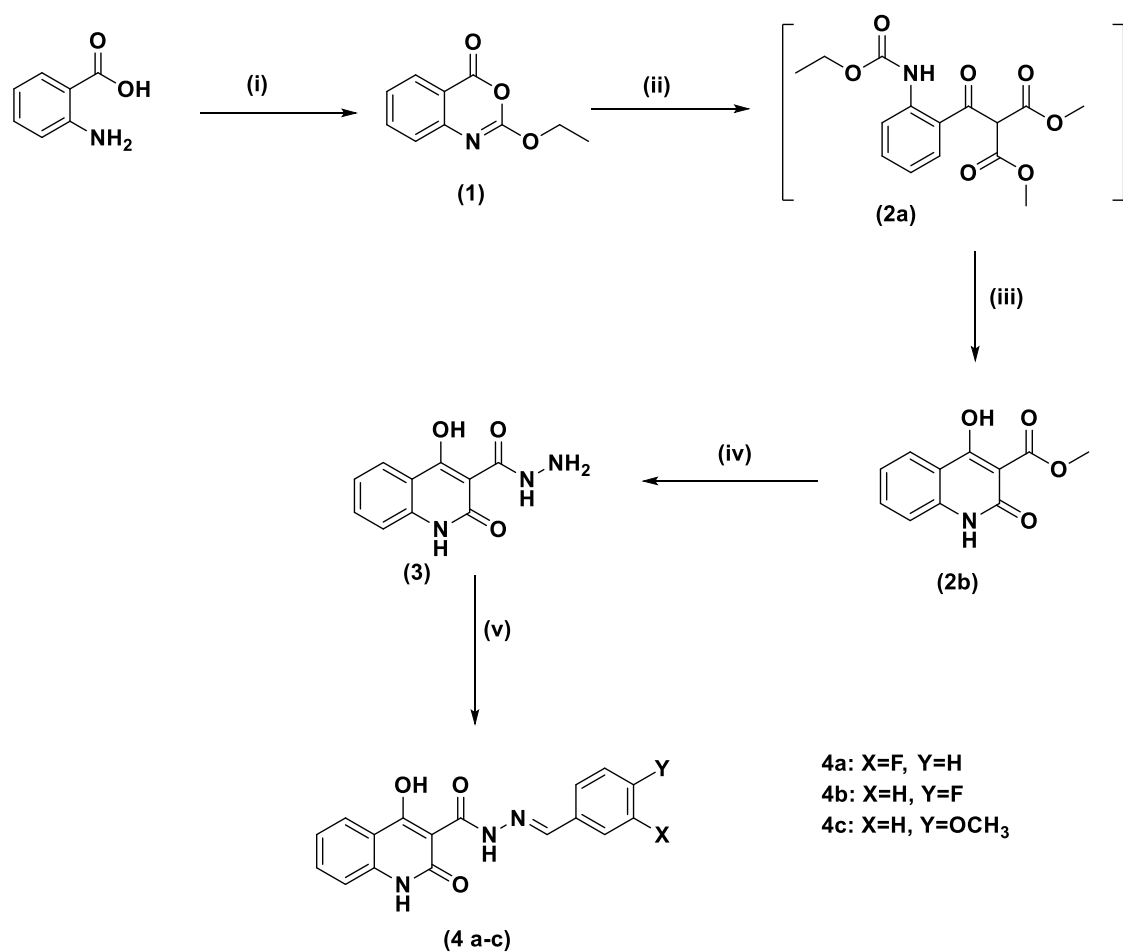
Στο δεύτερο μέρος της συνθετικής πορείας πραγματοποιήθηκε αντίδραση δύο σταδίων. Στο πρώτο στάδιο συντέθηκε ο **2-(2-((αιθόξυ καρβόνυλο) άμινο) βενζοΐλο) μηλονικός διμεθυλεστέρας (2a)** όπου αντέδρασε 1 ισοδύναμο 2-αιθόξυ-1,3-βενζοξαζιν-4-όνης, με 2 ισοδύναμα μηλονικού διμεθυλεστέρα (dimethyl malonate) παρουσία υδριδίου του νατρίου (NaH) σε διαλύτη τολουόλιο (PhMe). Κατά το δεύτερο στάδιο έγινε η κυκλοποίηση του παραπάνω προϊόντος (**2a**) προς **4-υδρόξυ-2-όξο-1,2-διϋδοκινολίνο-3-καρβοξυλικό μεθυλεστέρα (2b)** με τη χρήση μεθοξειδίου του νατρίου (MeONa) το οποίο παρασκευάστηκε εντός της σφαιρικής φιάλης λίγο πριν την αντίδραση. Χρησιμοποιήθηκε 1 ισοδύναμο αντιδρώντος (**2a**) με 2,5 ισοδύναμα NaH και 5 ισοδύναμα μεθανόλης (MeOH) καθώς και άνυδρο τολουόλιο (PhMe) ως διαλύτης.

Στο τρίτο μέρος της πειραματικής πορείας πραγματοποιήθηκε αντίδραση 1 ισοδύναμου του (**2b**) με 3 ισοδύναμα υδραζίνης ($\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) σε διαλύτη μεθανόλη (MeOH) για την παραγωγή του **4-υδρόξυ-2-όξο-1,2-διϋδοκινολίνο-3-καρβοϋδραζιδίου (3)** το οποίο αποτέλεσε και βασικό υπόστρωμα για τις περαιτέρω αντιδράσεις.

Στο τέταρτο μέρος ακολούθησαν αντιδράσεις του (**3**) με διαφορετικά μόνο-υποκατεστημένες (θέσεις 3 και 4) βενζαλδεΰδες προς την παραγωγή των **4a-4c**. Ένα ισοδύναμο του (**3**) αντέδρασε με 2,5 ισοδύναμα βενζαλδεΰδης (**a-c**) σε διαλύτη διμέθυλοφορμαμίδιο (DMF -άνυδρο) και 1-2 σταγόνες ο-φωσφορικό οξύ (85%) σε νερό (H_3PO_4) που χρησιμοποιήθηκε ως καταλύτης.

Παρακάτω παρουσιάζεται σχηματικά η γενική πορεία των αντιδράσεων που πραγματοποιήθηκαν.

Επισκόπηση Αντιδράσεων

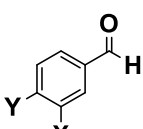


(i) ClCO₂Et (χλωρομυρμηγκικός αιθυλεστέρας), C₅H₅N (πυριδίνη) άνυδρη

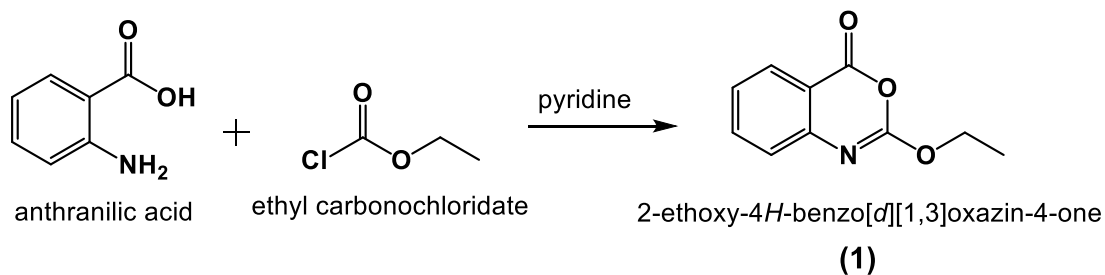
(ii) MeCO₂CH₂CO₂Me (μηλονικός διμεθυλεστέρας), NaH (υδριδίου του νατρίου), PhMe (τολουόλιο) άνυδρο

(iii) MeONa (μεθοξείδιο του νατρίου), MeOH + NaH, PhMe (τολουόλιο) άνυδρο

(iv) H₂NNH₂.H₂O (υδραζίνη), MeOH (μεθανόλη)

(v)  (μόνο-υποκατεστημένη βενζαλδεΰδη), DMF άνυδρο (διμέθυλοφορμαμίδιο), H₃PO₄ 85% (ο-φωσφορικό οξύ)

Σύνθεση της 2-αιθοξυ-1,3-βενζοξαζιν-4-όνης (1)



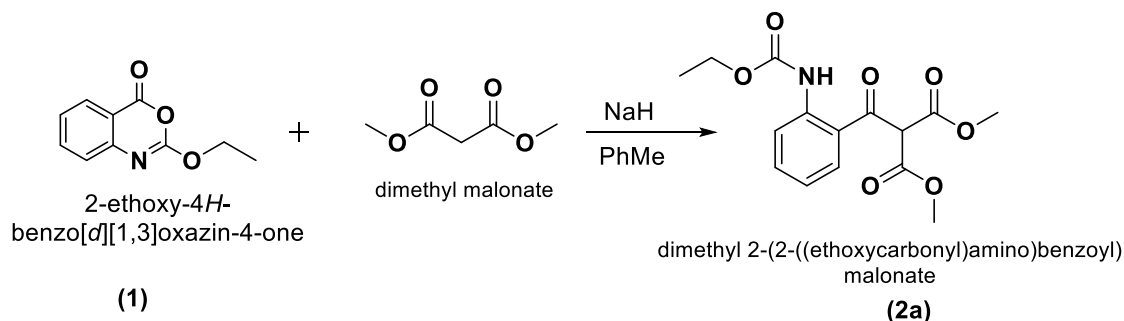
Πειραματική Πορεία του (1)

Αρχικά διαλύθηκαν 1 ισοδύναμο ($n = 0,020 \text{ mol}$, $m = 2,743 \text{ gr}$, $M_r = 123.65 \text{ gr/mol}$) ανθρανιλικού οξέος στην άνυδρη πυριδίνη ($V=20 \text{ ml}$) και στη συνέχεια έγινε προσθήκη του χλωρομυρμηγκικού αιθυλεστέρα ($n=0,080 \text{ mol}$, $m=8,68 \text{ gr}$, $d=1,139 \text{ gr/ml}$, $V=7,6 \text{ ml}$) στάγδην, που διήρκεσε περίπου 10-15 min. Κατά τη διάρκεια της προσθήκης χρησιμοποιήθηκε παγόλουτρο λόγω αύξησης της θερμοκρασίας, ενώ αργότερα παρατηρήθηκε παραπροϊόν (χλωριούχο άλας της πυριδίνης) το οποίο όμως ήταν διαλυτό στο νερό. Συνολικά η αντίδραση διήρκεσε 3,5h και καθ' όλη την πορεία της αντίδρασης γινόταν έλεγχος με TLC. Το τελικό προϊόν απομονώθηκε μετά από εξάτμιση του διαλύτη με περιστροφικό εξάτμιστήρα, προσθήκη παγωμένου νερού υπό ισχυρή ανάδευση, διήθηση με χρήση υδραντλίας κενού και έκπλυση με παγωμένο νερό. Ακολούθησε ανακρυστάλλωση του προϊόντος, για πλήρη καθαρισμό, με τη χρήση Hex/AcOEt (εξάνιο/οξικό αιθυλεστέρα) σε αναλογία 1:1 ως διαλύτη ανακρυστάλλωσης στους 70°C σε υδατόλουτρο.

Πίνακας 1.1: Χαρακτηριστικά του (1)

Μοριακό Βάρος (M_r)	191,19
Σημείο Τήξεως (T_m)	$92-93^\circ\text{C}$
TLC:Hex/AcOEt (4:1)	$R_f:0.57$
Απόδοση	78%

Σύνθεση του 2-(2-((αιθοξύ καρβόνυλο) αμινο) βενζόυλο) μηλονικός διμεθυλεστέρας
(2a)



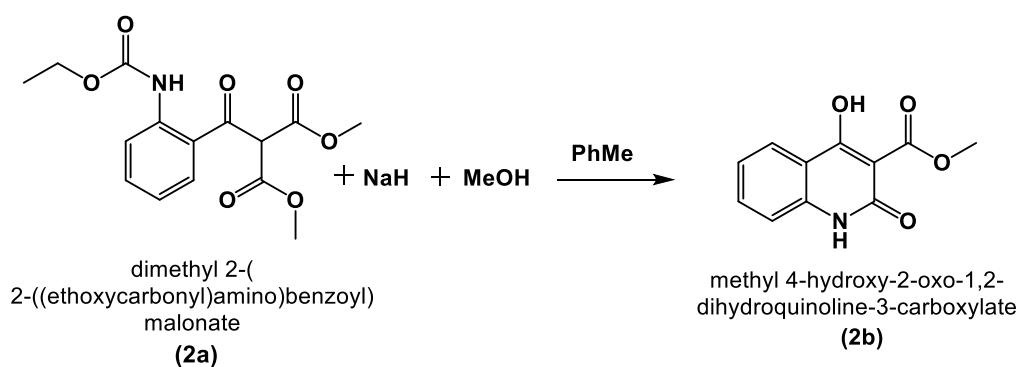
Πειραματική Πορεία του (2a)

Σε αυτό το στάδιο χρησιμοποιήθηκαν 2 ισοδύναμα NaH ($n=3,8$ mmol, $m=0,152$ gr, $Mr=24$) ως εναιώρημα σε άνδρο PhMe ($V=25$ ml) και στη συνέχεια προστέθηκε σταγόδην ο μηλονικός διμεθυλεστέρας ($V=434$ μ lt, $m=0,502$ gr, $d=1,156$ gr/ml, $Mr=132,11$) οπότε παρατηρήθηκε και έκλυση H_2 . Το μίγμα αναδεύτηκε για 45 min σε θερμοκρασία δωματίου (room temperature: rt) και τέλος προστέθηκε το 1 ισοδύναμο της βενζοξαζινόνης ($n=1,9$ mmol, $m=0,365$ gr, $Mr=191,19$). Συνεχίστηκε η ανάδευση σε rt για περίπου 4h μέχρι να φανεί στο TLC πλήρη κατανάλωση της βενζοξαζινόνης. Μετά το πέρας της αντίδρασης προστέθηκε H_2O ($V=10$ ml) υπό ισχυρή ανάδευση και ακολούθησε εκχύλιση του μίγματος με H_2O (2×5 ml), παραλαβή της υδατικής φάσης και έκπλυσή της με εξάνιο ($Hex=10$ ml). Τέλος έγινε οξίνιση με HCl 4M -υπό ψύξη- μέχρι pH=3, διήθηση με χρήση υδραντλίας κενού και παραλαβή του στερεού (2a).

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά του (2a)

Μοριακό Βάρος (Mr)	309,27
TLC:Hex/AcOEt (9:1)	Rf:0,35
Απόδοση	87%

Σύνθεση του 4-υδροξυ-2-οξο-1,2-διϋδοκινολινο-3-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα (2b)



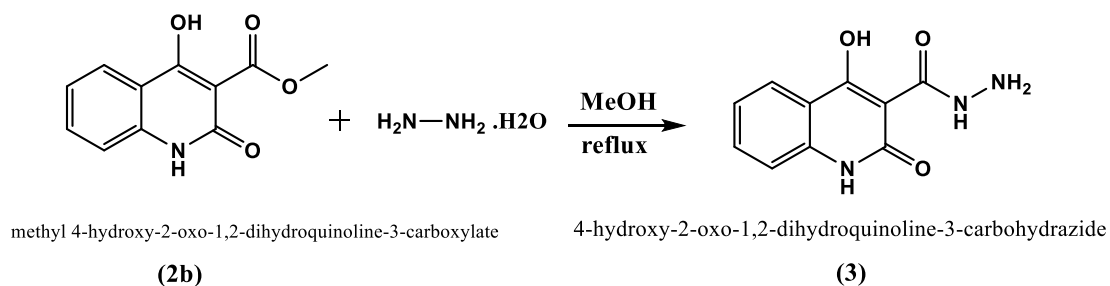
Πειραματική Πορεία του (2b)

Αρχικά σε ενιαίωρημα 2,5 ισοδύναμων NaH ($n=3,75\text{mmol}$, $m=0,150\text{gr}$, $M_r=24$) προστίθενται τα 5 ισοδύναμα MeOH ($n=7,5\text{mmol}$, $d=0,793\text{gr/ml}$, $V=400\mu\text{lt}$, $M_r=34,02$) σε PhMe ($V=15\text{ml}$) προκειμένου να σχηματιστεί MeONa λίγο πριν την έναρξη της αντίδρασης. Προστέθηκε 1 ισοδύναμο ($n=1,5\text{mmol}$, $m=0,485\text{gr}$) του αντιδρώντος (2a) και το μίγμα αναδεύτηκε υπό θέρμανση με reflux για περίπου 3h. Μετά το πέρας της αντίδρασης απομακρύνθηκε ο διαλύτης με τη χρήση περιστροφικού εξατμιστήρα. Το στερεό υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε σε H_2O , ακολούθησε οξίνιση με HCl 4M έως $\text{pH}=2$ μέχρι να σχηματιστεί στερεό (2b) και έγινε διήθηση και έκπλυση με παγωμένο H_2O .

Πίνακας 3: Χαρακτηριστικά του (2b)

Μοριακό Βάρος (M_r)	219,20
Σημείο Τήξεως (T_m)	228-230°C
TLC: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (19:1)	Rf:0,55
Απόδοση	80%

Σύνθεση του 4-υδροξύ-2-όξο-1,2-διϋδροκινολινο-3-καρβοϋδραζιδίου (3)



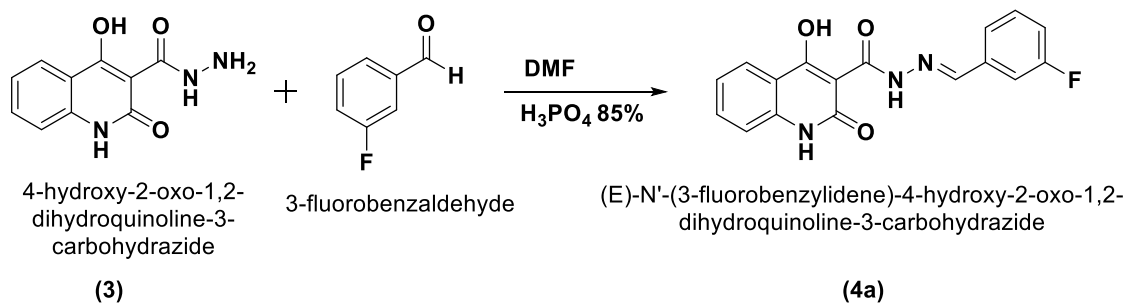
Πειραματική Πορεία του (3)

Το ένα ισοδύναμο ($n=1\text{ mmol}$, $m=0,219\text{ gr}$, $M_r=219,20$) (2b) διαλύθηκε μερικώς σε MeOH ($V=4,5\text{ ml}$) όπου δημιουργήθηκε μια λευκή πάστα. Προστέθηκαν τα 3 ισοδύναμα της υδραζίνης ($n=1,5\text{ mmol}$, $d=1,027\text{ gr/ml}$, $V=100\text{ }\mu\text{lt}$, $M_r=50,06$) και το μίγμα θερμάνθηκε σε ελαιόλουτρο με reflux στους $80-90^\circ\text{C}$ για περίπου 5h. Μετά το πέρας της αντίδρασης έγινε διήθηση για την παραλαβή του στερεού (3) και έκπλυση με ψυχρή MeOH.

Πίνακας 4: Χαρακτηριστικά του 3

Μοριακό Βάρος (M_r)	219,20
Σημείο Τήξεως (T_m)	$228-230^\circ\text{C}$
TLC: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (19:1)	$R_f: 0,55$
Απόδοση	80%

Σύνθεση του (E)-N'-(3 φθοροβενζυλιδενο)-4-υδροξύ-2-οξο-1,2-διϋδροκινολίνο-3-καρβοϋδραζίδιον (4a)



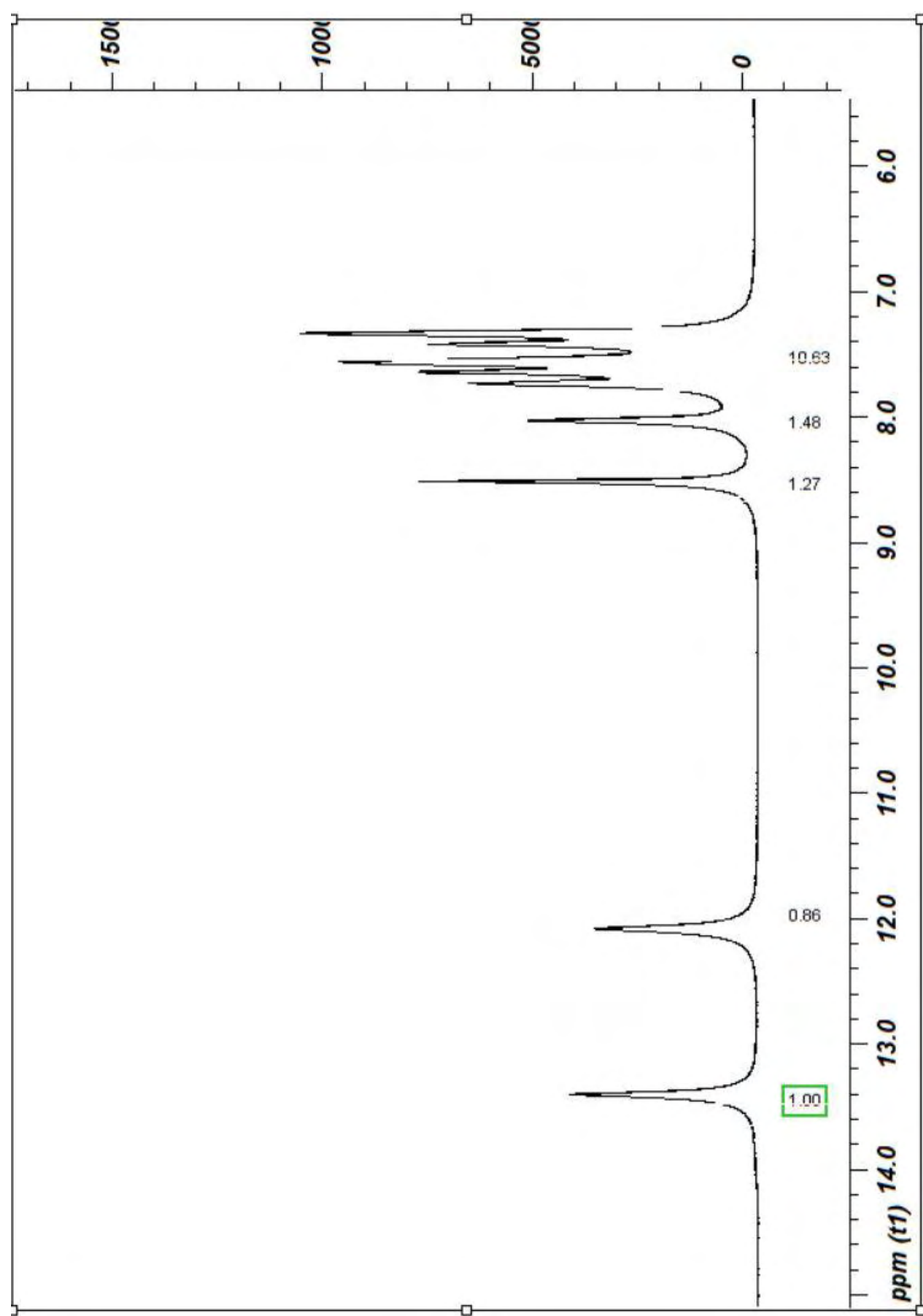
Πειραματική Πορεία του (4a)

Για κάθε 1 ισοδύναμο ($n=0,10\text{mmol}$, $m=22\text{mg}$, $M_r=219,20\text{gr/mol}$) του (3) χρησιμοποιήθηκαν 2,5 ισοδύναμα ($n=0,25\text{mmol}$, $d=1,17\text{gr/ml}$, $m=31\text{mg}$, $V=26,5\text{ml}$, $M_r=124,11$) της 3- φθοροβενζαλδεϋδης σε διαλύτη DMF άνυδρο ($V=1\text{ml}$) όπου προστέθηκαν και 1-2 σταγόνες φωσφορικού οξέος (H_3PO_4 85%) ως καταλύτης. Η αντίδραση έγινε με θέρμανση σε ελαιόλουτρο στους 110°C και ο χρόνος κυμάνθηκε μεταξύ 10-12h. Η παραλαβή του προϊόντος (4a) έγινε με διήθηση σε ηθμό με χρήση υδραντλίας κενού. Έκπλυση του στερεού υπολείμματος έγινε πρώτα με μερικές σταγόνες DMF και στη συνέχεια με 1-2ml διαιθυλαιθέρα (Et_2O).

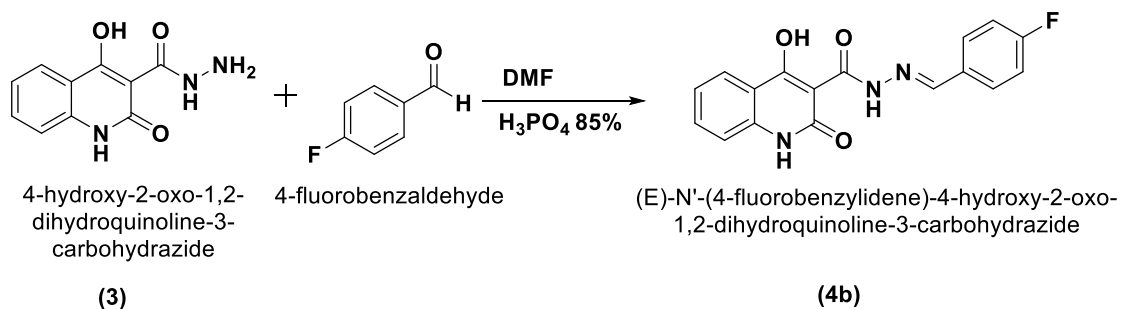
Πίνακας 5: Χαρακτηριστικά του (4a)

Μοριακό Βάρος (M_r)	325,30
Σημείο Τήξεως (T_m)	$>320^\circ\text{C}$
TLC: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (19:1)	Rf:0,6
Απόδοση	52%

Φάσμα ^1H -NMR του (4a)



Σύνθεση του (E)-N'-(4-φθοροβενζυλιδενο)-4-υδροξύ-2-οξο-1,2διϋδροκινολινο -3-καρβοϋδραζιδίου (4b)



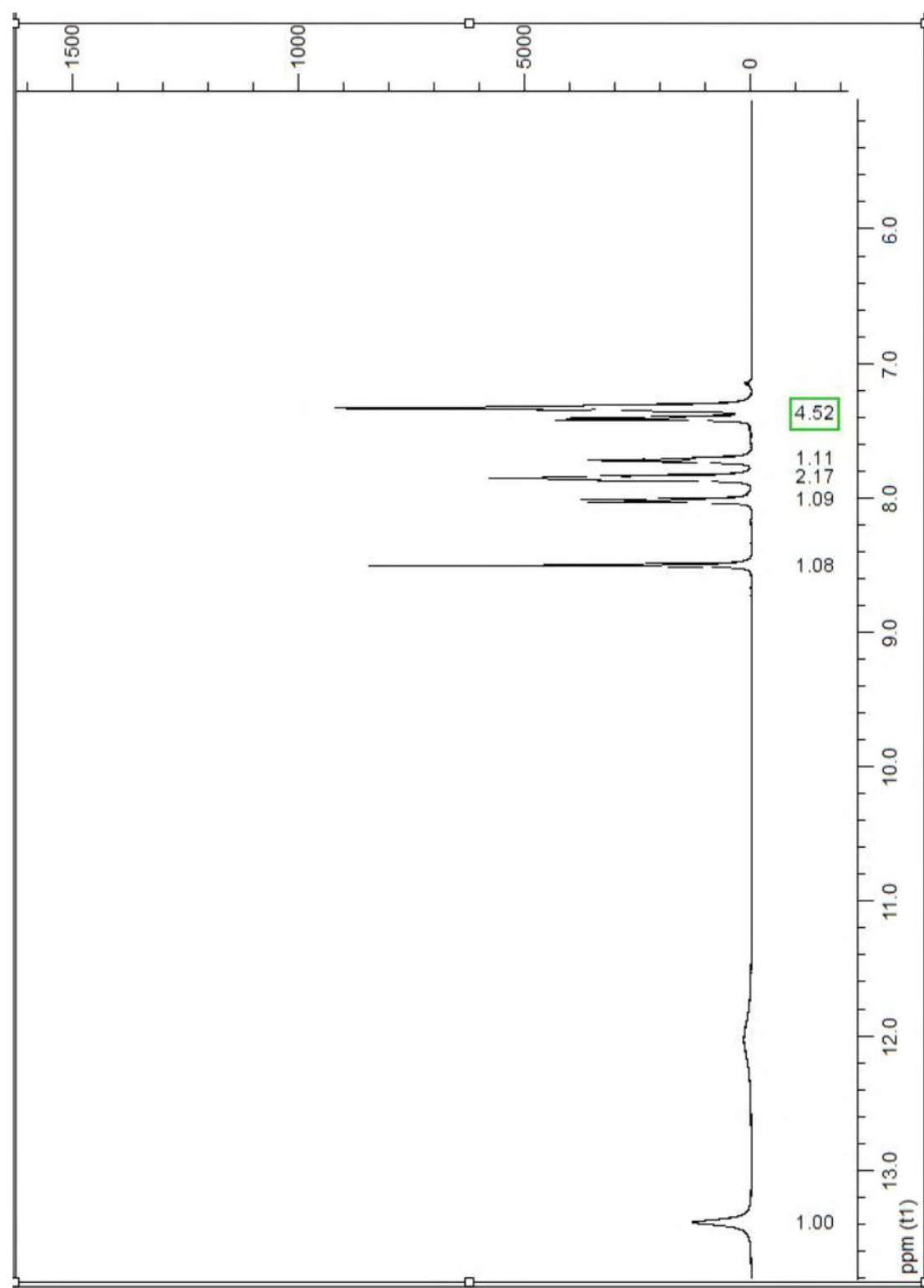
Πειραματική Πορεία του (4b)

Η πειραματική πορεία καθώς και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν είναι ίδιες με την παραπάνω αντίδραση για τη σύνθεση του (4a). Για κάθε 1 ισοδύναμο ($n=0,10\text{mmol}$, $m=22\text{mg}$, $\text{Mr}=219,20\text{gr/mol}$) του (3) χρησιμοποιήθηκαν 2,5 ισοδύναμα ($n=0,25\text{mmol}$, $d=1,17\text{gr/ml}$, $m=31\text{mg}$, $V=26,5\text{ml}$, $\text{Mr}=124,11$) της 3-φθορόβενζαλδεϋδης σε διαλύτη DMF άνυδρο ($V=1\text{ml}$) όπου προστέθηκαν και 1-2 σταγόνες φωσφορικού οξέος (H_3PO_4 85%) ως καταλύτης. Η αντίδραση έγινε σε ελαιόλουτρο των 110°C και ο χρόνος κυμάνθηκε μεταξύ 10-12h.. Η παραλαβή του προϊόντος (4b) έγινε με διήθηση σε ηθμό με χρήση υδραντλίας κενού. Έκπλυση του στερεού υπολείμματος έγινε πρώτα με μερικές σταγόνες DMF και στη συνέχεια με 1-2ml διαιθυλαιθέρα (Et_2O).

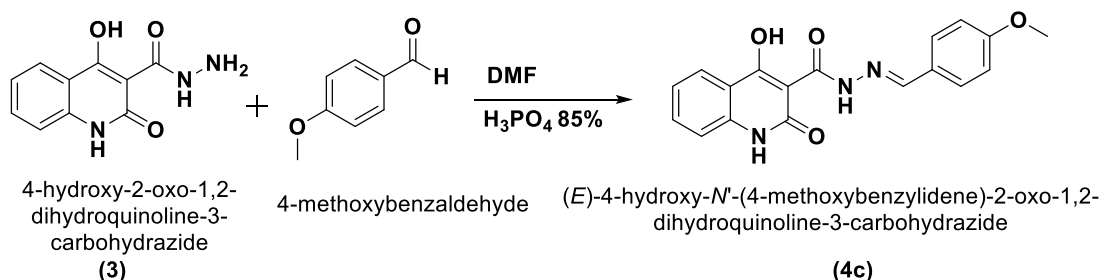
Πίνακας 6: Χαρακτηριστικά του (4b)

Μοριακό Βάρος (Mr)	325,30
Σημείο Τήξεως (Tm)	$>320^\circ\text{C}$
TLC: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (19:1)	Rf:0,52
Απόδοση	62%

Φάσμα ^1H -NMR του (4b)



Σύνθεση του (E)-4-υδροξύ-N-(4-μεθοξυβενζυλιδενο)-2-οξο-1,2-διϋδροκινολινο -3-καρβοϋδραζιδίου (4c)



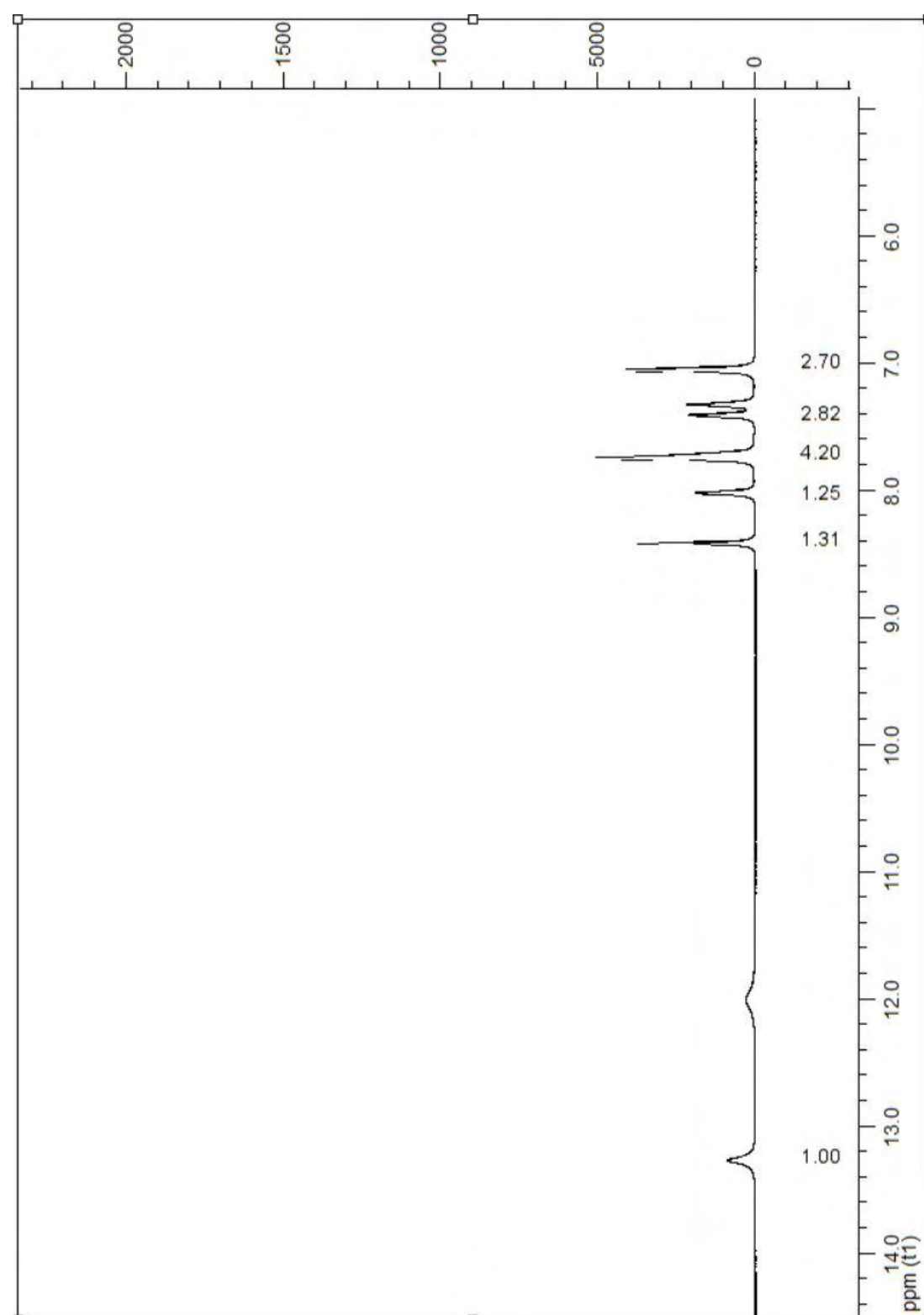
Πειραματική Πορεία του (4c)

Σε στεγνή σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκε 1 ισοδύναμο ($n=0,10\text{mmol}$, $m=22\text{mg}$, $M_r=219,20$) του (3) και προστέθηκε ο διαλύτης: άνυδρο DMF ($V=1\text{ml}$) υπό ρεύμα αζώτου και 1-2 σταγόνες φωσφορικού οξέος (H_3PO_4 85%) ως καταλύτης. Χρησιμοποιήθηκαν 2,5 ισοδύναμα ($n=0,25\text{mmol}$, $m=34\text{mg}$, $d=1,119 \text{ gr/ml}$, $V=30,41\mu\text{lt}$, $M_r=136,15$) της p-ανισαλδεΐδης (4-μεθοξυβενζαλδεΐδη). Το μίγμα τοποθετήθηκε σε ελαιόλουτρο στους 110°C όπου στα πρώτα 10min το διάλυμα διαύγαζε ενώ αμέσως μετά ξεκίνησε να καθιζάνει στερεό προϊόν και η αντίδραση διήρκησε 4,5h. Η παραλαβή του στερεού προϊόντος έγινε με διήθηση σε ηθμό με τη χρήση υδραντλίας κενού και έγιναν πλύσεις αυτού με DMF και Et_2O .

Πίνακας 7: Χαρακτηριστικά του (4c)

Μοριακό Βάρος (M_r)	337,34
Σημείο Τήξεως (T_m)	$>320^\circ\text{C}$
TLC: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (19:1)	$R_f:0,6$
Απόδοση	68%

Φάσμα ^1H -NMR του (4c)



3.6 Επισκόπηση Πειραματικής Πορείας Υποκατεστημένων στο N, Παραγώγων Κινολίνης

Στο πρώτο μέρος των αντιδράσεων έγινε σύνθεση του **N-μέθυλο ισατοϊκού ανυδρίτη (6)** με ενδιάμεσο σχηματιζόμενο προϊόν το **2-((αιθόξυκαρβόνυλο) (μέθυλο) άμινο) βενζοϊκό οξύ (5)**. Χρησιμοποιήθηκε 1 ισοδύναμο N-μέθυλο ανθρανιλικού οξέος, 0,7 ισοδύναμο χλωρομυρμηγκικού οξέος (το οποίο λειτούργησε και ως διαλύτης), και μετά το σχηματισμό του (5) μετά από 15min προστέθηκαν 1,2 ισοδύναμα ακέτυλο χλωρίδιο.

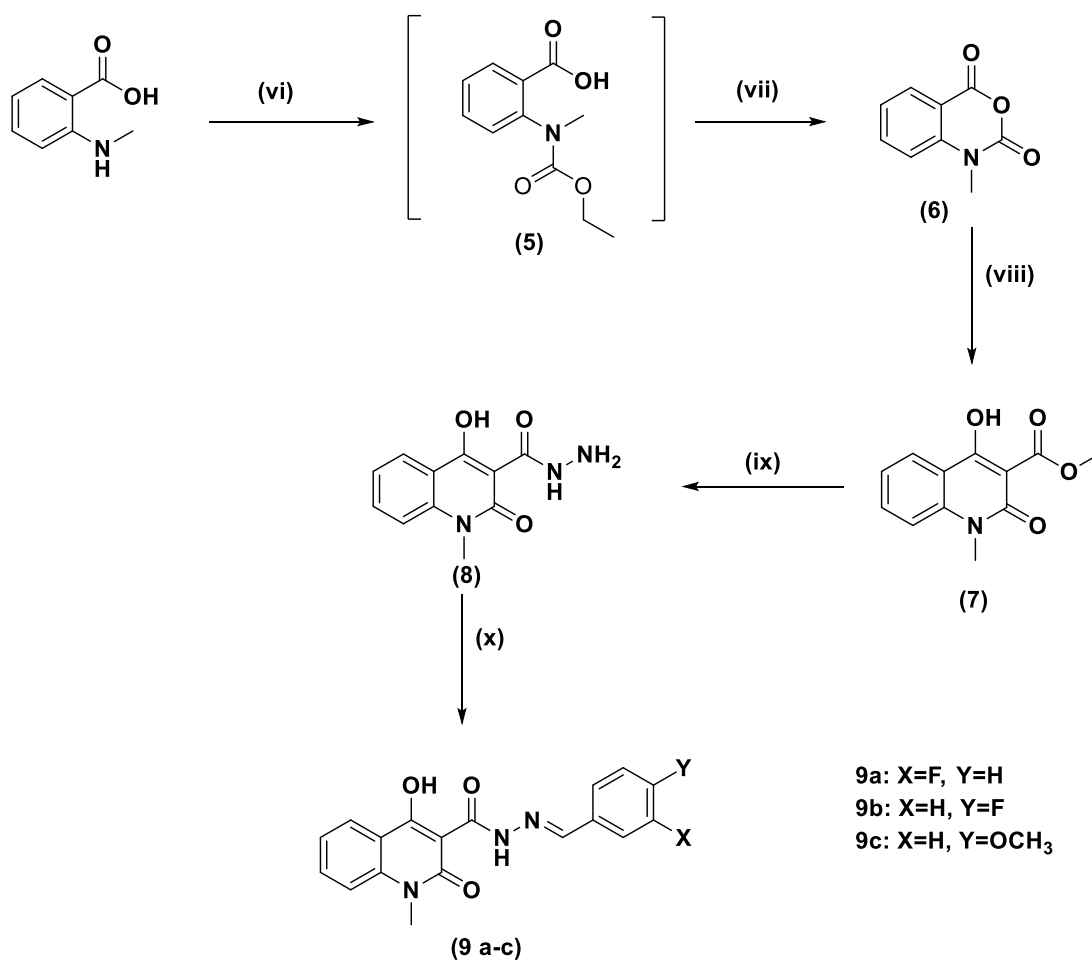
Στο δεύτερο μέρος των αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκε 1 ισοδύναμο από τον **N-μέθυλο ισατοϊκό ανυδρίτη (6)** με 1,5 ισοδύναμο μηλονικού διμεθυλεστέρα σε διαλύτη διμέθυλοφορμαμίδιο (DMF) και 1,5 ισοδύναμο υδρίδιο του νατρίου (NaH) προς σχηματισμό του **4-υδρόξυ-1-μεθυλο-2-οξο-1,2-διϋδροκινολίνο-3-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα (7)**.

Στο τρίτο μέρος των αντιδράσεων σχηματίστηκε το **4-υδρόξυ-1-μέθυλ-2-οξο-1,2-διϋδροκινολίνο-3-καρβοϋδραζίδιο (8)**. Για το σχηματισμό αυτού του προϊόντος χρησιμοποιήθηκε 1 ισοδύναμο του **4-υδρόξυ-1-μεθυλ-2-οξο-1,2-διϋδροκινολίνο-3-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα (7)** με 3 ισοδύναμα υδραζίνης σε διαλυτή μεθανόλη (MeOH). Το προϊόν (8) αποτέλεσε κοινό υπόστρωμα για τις περεταίρω αντιδράσεις.

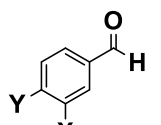
Στο τέταρτο μέρος των αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκε 1 ισοδύναμο του **4-υδρόξυ-1-μέθυλ-2-οξο-1,2-διϋδροκινολίνο-3-καρβοϋδραζίδιο (8)** με 1,5 ισοδύναμα της εκάστοτε μόνο υποκατεστημένης βενζαλδεϋδης που χρησιμοποιήθηκε, σε διαλύτη DMF και με καταλύτη *o*-φωσφορικό οξύ. Αυτές οι αντιδράσεις έδωσαν τα προϊόντα **(9 a-c)**.

Παρακάτω παρουσιάζεται σχηματικά η γενική πορεία των αντιδράσεων.

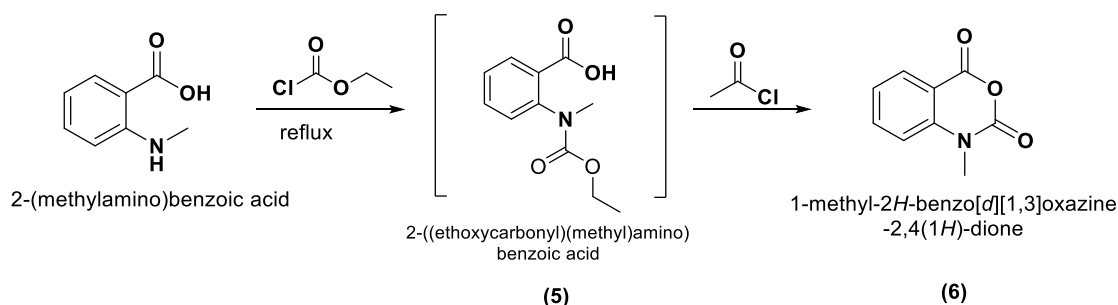
Επισκόπηση Αντιδράσεων



- (i) ClCO₂Et (χλωρομυρμηγκικός αιθυλεστέρας)
 (ii) CH₃CO₂Cl (ακέτυλο χλωρίδιο)
 (iii) CO₂CH₂CO₂Me (μηλονικός διμεθυλεστέρας), NaH (υδριδίου του νατρίου), DMF (διμέθυλο φορμαμίδιο) άνυδρο
 (iv) H₂NNH₂·H₂O (υδραζίνη), MeOH (μεθανόλη)

- (v)  (μόνο-υποκατεστημένη βενζαλδεΐδη), DMF άνυδρο
 (διμέθυλοφορμαμίδιο), H₃PO₄ 85% (ο-φωσφορικό οξύ)

Σύνθεση του N-μέθυλο ισατοϊκού ανυδρίτη (6) με ενδιάμεσο προϊόν το 2-((αιθοξυκαρβονύλο) (μέθυλο) άμινο) βενζοϊκό οξύ (5)



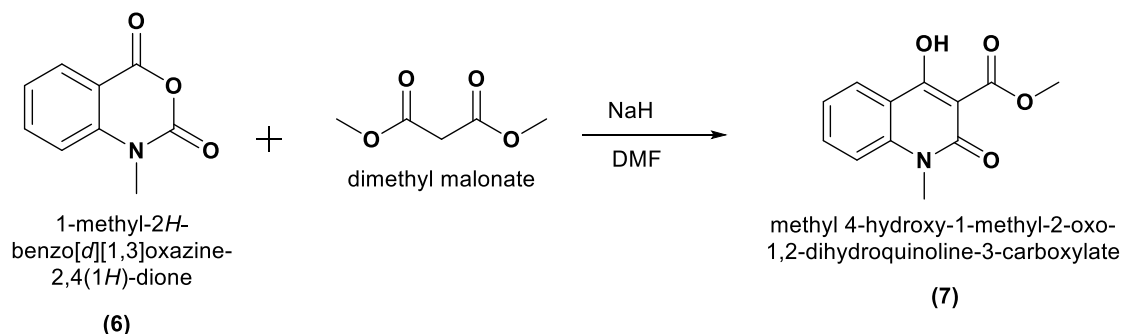
Πειραματική Πορεία του (6)

Σε σφαιρική φιάλη ζυγίστηκε το N-μέθυλο ανθρανιλικό οξύ ($m=406\text{mg}$, $n=2,7\text{mmol}$, $M_r=151,17$), προστέθηκε ο χλωρομυρμηγκικός αιθυλεστέρας ($V=2\text{ml}$, $n=2,1\text{mmol}$, $d=1,139\text{ gr/ml}$, $M_r=108,52$) και τοποθετήθηκαν σε ελαιόλουτρο στους 110°C με reflux για 15 min. Το σύστημα αφέθηκε ανοιχτό διότι έβγαζε ατμούς HCl. Μόλις σταμάτησε να παράγεται HCl είχε σχηματιστεί το (5) και προστέθηκε σε αυτό το ακέτυλο χλωρίδιο ($n=3.2\text{mmol}$, $V=211\mu\text{lt}$, $d=1,104\text{ gr/ml}$, $M_r=78.50$) και το σύστημα θερμάνθηκε με ανάδευση για άλλη 1h. Τέλος το μίγμα αφέθηκε να ψυχθεί αργά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια στο ψυγείο για να επιτευχθεί επιπλέον καταβύθιση του στερεού προϊόντος (6). Αυτό συλλέχθηκε με διήθηση και καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης υψηλής απόδοσης.

Πίνακας 8: Χαρακτηριστικά του 6

Μοριακό Βάρος (M_r)	164,14
Σημείο Τήξεως (T_m)	182-183°C
TLC:AcOEt/Hex (9:1)	Rf:0,33

Σύνθεση του 4-υδροξυ-1-μεθυλ-2-οξο-1,2-διϋδροκινολινο-3-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα (7).



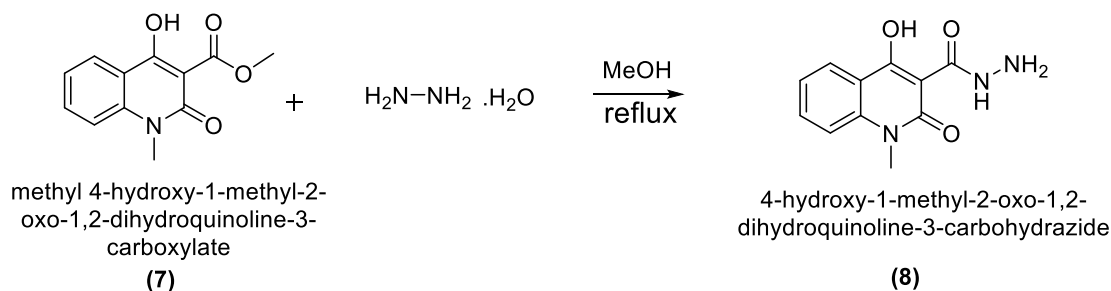
Πειραματική Πορεία του (7)

Σε στεγνή σφαιρική φιάλη ζυγίστηκαν ($m=0,102\text{gr}$, $n=2,55\text{mmol}$, $Mr=24$) NaH υπό ρεύμα αζώτου και προστέθηκε ο διαλύτης DMF ($V=10\text{ml}$). Μετά από μερική ανάδευση προστέθηκε ο μεθονικός διμεθυλεστέρας ($n=2,55\text{mmol}$, $m=0,337\text{gr}$, $d=1,156\text{ gr/ml}$, $V=291\text{ μlt}$, $Mr=132,11$), όπου παρατηρήθηκε έκλυση H_2 , και στη συνέχεια ο ισοτοϊκός ανυδρίτης ($n=1,7\text{mmol}$, $m=0,303\text{gr}$, $mr=177,16$). Η σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκε σε ελαιόλουτρο στους $80-90^\circ\text{C}$ και μετά από μία ώρα σχηματίστηκε λευκό στερεό. Η αντίδραση συνολικά διήρκεσε 4h και σταμάτησε με την προσθήκη 80ml μείγματος πάγου-νερού. Έγινε οξίνιση του διαλύματος, υπό ψύξη, με HCl 4M μέχρι $\text{pH}=2$. Μόλις ολοκληρώθηκε η καθίζηση του στερεού, έγινε διήθηση σε ηθμό με χρήση υδραντλίας κενού και ακολούθησαν πλύσεις του στερεού με παγόνερο.

Πίνακας 9: Χαρακτηριστικά του 7

Μοριακό Βάρος (Mr)	233,22
Σημείο Τήξεως (Tm)	160-165°C
TLC: AcOEt/Hex (1:1)	Rf:0,2
Απόδοση	73%

Σύνθεση του 4-υδροξύ-1-μέθυλ-2-οξο-1,2 διϋδροκινολινο-3-καρβοϋδραζιδίου (8)



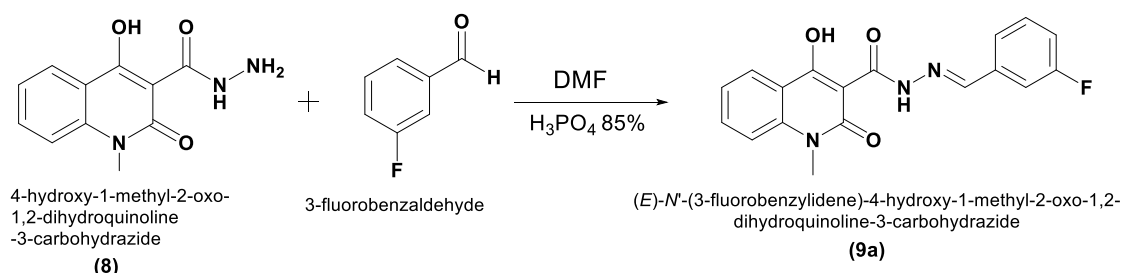
Πειραματική Πορεία του (8)

Το ένα ισοδύναμο ($n=1,07\text{mmol}$, $m=0,250\text{gr}$, $Mr=233,22$) (7) διαλύθηκε μερικώς σε MeOH ($V=10\text{ml}$) όπου δημιουργήθηκε μια λευκή πάστα. Προστέθηκαν τα 3 ισοδύναμα της υδραζίνης ($n=3,2\text{mmol}$, $d=1,027\text{ gr/ml}$, $V=156\mu\text{lt}$, $Mr=50,06$) και το μίγμα θερμάνθηκε με reflux σε ελαιόλουτρο στους $90-95^{\circ}\text{C}$ για περίπου 5h. Μετά το πέρας της αντίδρασης έγινε διήθηση για την παραλαβή του στερεού (8) και έκπλυση με ψυχρή MeOH.

Πίνακας 10: Χαρακτηριστικά του 8

Μοριακό Βάρος (Mr)	218,19
Σημείο Τήξεως (Tm)	$>320^{\circ}\text{C}$
TLC: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (19:1)	Rf:0,84
Απόδοση	80%

Σύνθεση του (E)-N-(3-φθοροβενζιλιδενο)-4-υδροξυ-1-μέθυλο-2-οξο-1,2-διϋδροκινολινο-3-καρβοϋδραζιδίου (9a)



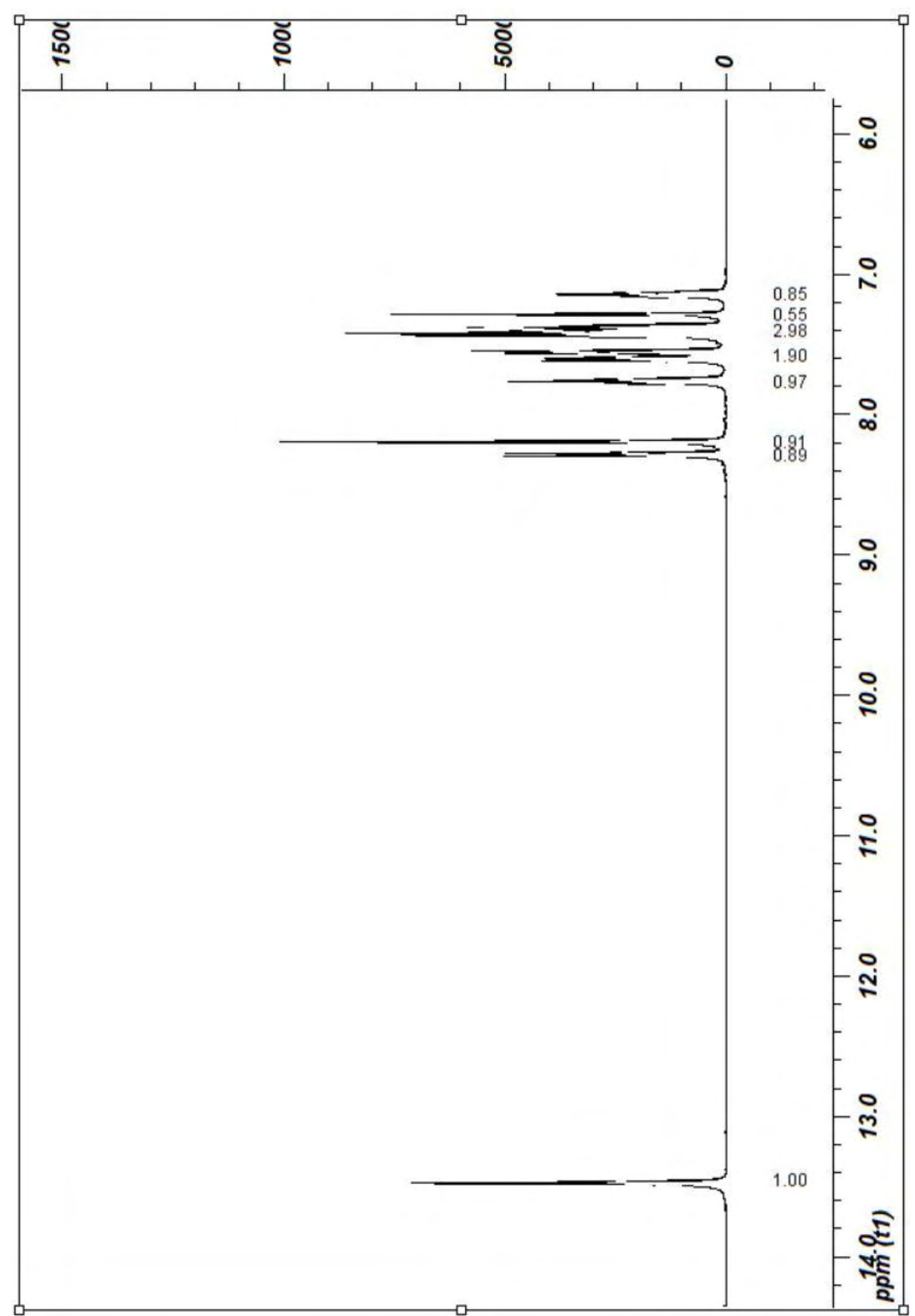
Πειραματική Πορεία του (9a)

Για κάθε 1 ισοδύναμο ($n=0,10\text{mmol}$, $m=23\text{mg}$, $M_r=233,22\text{gr/mol}$) του (8) χρησιμοποιήθηκαν 1,5 ισοδύναμα ($n=0,15\text{mmol}$, $d=1,17\text{gr/ml}$, $m=18,6\text{mg}$, $V=15,8\mu\text{lt}$, $M_r=124,11$) της 3- φθοροβενζαλδεϋδης σε διαλύτη DMF άνυδρο ($V=1\text{ml}$) όπου προστέθηκαν και 1-2 σταγόνες φωσφορικού οξέος (H_3PO_4 85%) ως καταλύτης. Η αντίδραση έγινε σε ελαιόλουτρο στους 110°C και ο χρόνος κυμάνθηκε μεταξύ 10-12h.. Η παραλαβή του προϊόντος (9a) έγινε με διήθηση σε ηθμό με χρήση υδραντλίας κενού. Έκπλυση του στερεού υπολείμματος έγινε με μερικές σταγόνες DMF.

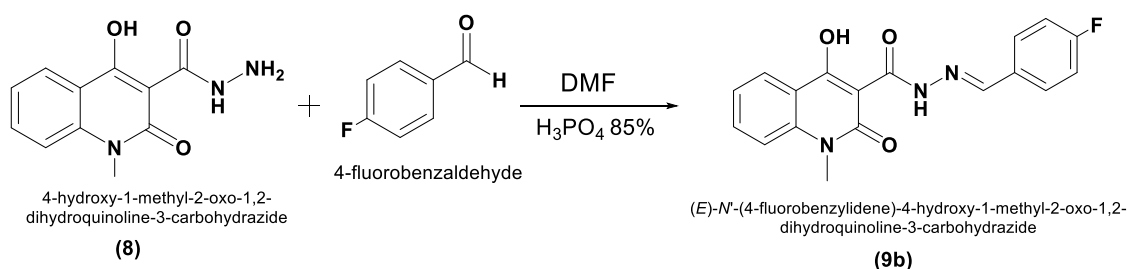
Πίνακας 11: Χαρακτηριστικά του (9a)

Μοριακό Βάρος (M_r)	339,33
Σημείο Τήξεως (T_m)	$>320^\circ\text{C}$
TLC: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (19,5:0,5)	$R_f:0,7$
Απόδοση	50%

Φάσμα ^1H -NMR του (9a)



Σύνθεση του (E)-N-4-φθοροβενζιλιδενό-4-υδροξυ-1-μέθυλο-2-οξο-1,2-διϋδροκινολινο-3-καρβοϋδραζιδίου (9b)



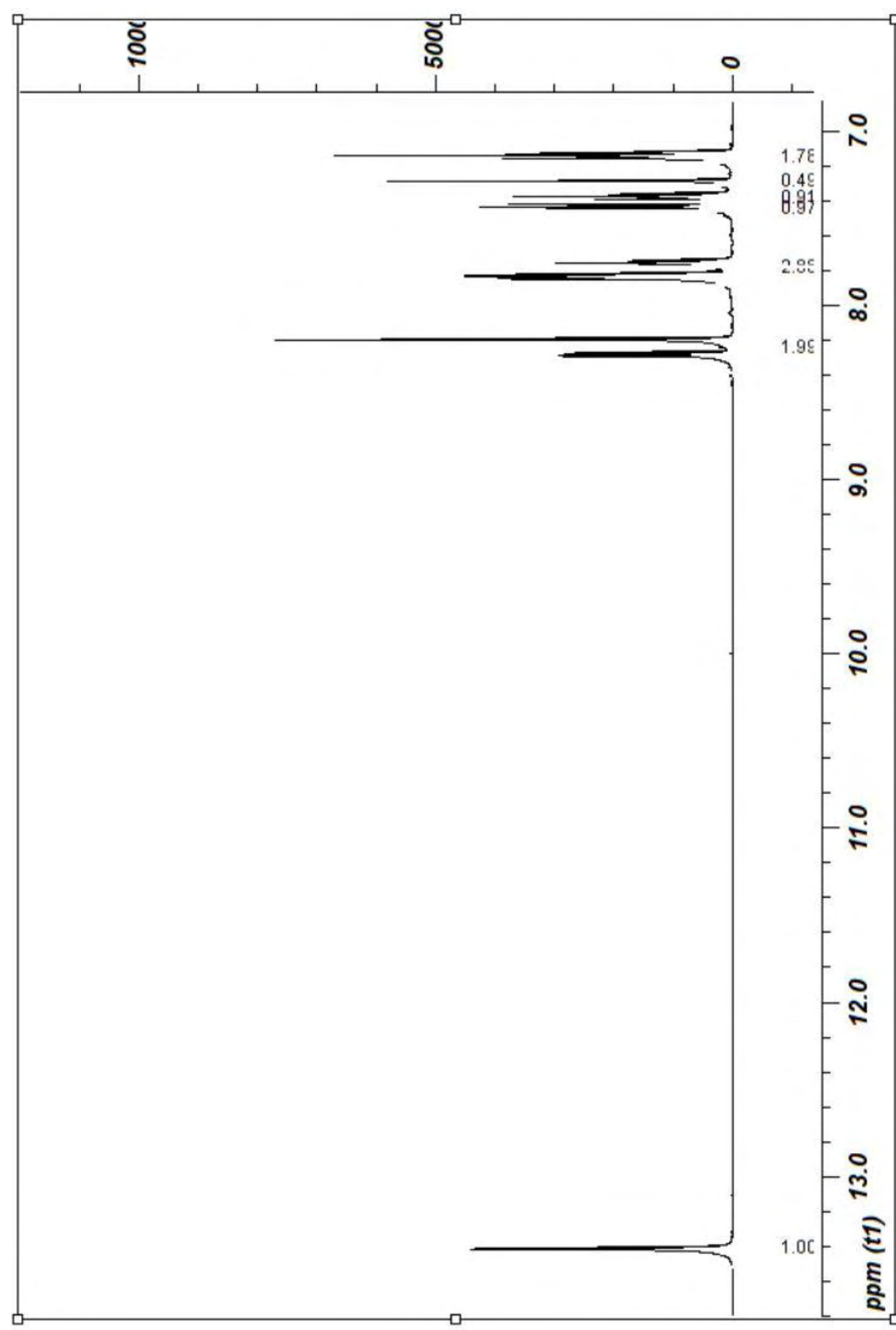
Πειραματική Πορεία του (9b)

Για κάθε 1 ισοδύναμο ($n=0,10\text{mmol}$, $m=23\text{mg}$, $M_r=233,22\text{gr/mol}$) του (8) χρησιμοποιήθηκαν 1,5 ισοδύναμα ($n=0,15\text{mmol}$, $d=1,17\text{gr/ml}$, $m=18,6\text{mg}$, $V=15,8\text{ml}$, $M_r=124,11$) της 3- φθοροβενζαλδεϋδης σε διαλύτη DMF άνυδρο ($V=1\text{ml}$) όπου προστέθηκαν και 1-2 σταγόνες φωσφορικού οξέος (H_3PO_4 85%) ως καταλύτης. Η αντίδραση έγινε σε ελαιόλουτρο των 110°C και ο χρόνος κυμάνθηκε μεταξύ 10-12h.. Η παραλαβή του προϊόντος (9b) έγινε με διήθηση σε ηθμό με χρήση υδραντλίας κενού. Έκπλυση του στερεού υπολείμματος έγινε με μερικές σταγόνες DMF .

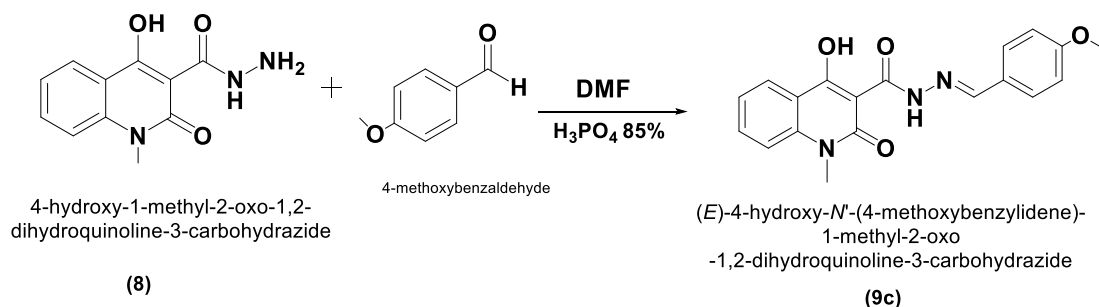
Πίνακας 12: Χαρακτηριστικά του (9b)

Μοριακό Βάρος (M_r)	339,33
Σημείο Τήξεως (T_m)	$>320^\circ\text{C}$
TLC: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (19,5:0,5)	$R_f:0,6$
Απόδοση	58%

Φάσμα ^1H -NMR του (9b)



Σύνθεση του (E)-4-υδροξύ-N-(4-μεθοξυβενζυλιδενο)-1-μεθυλο-2-οξο-1,2-διϋδροκινολινο-3-καρβοϋδραζιδίου (9c)



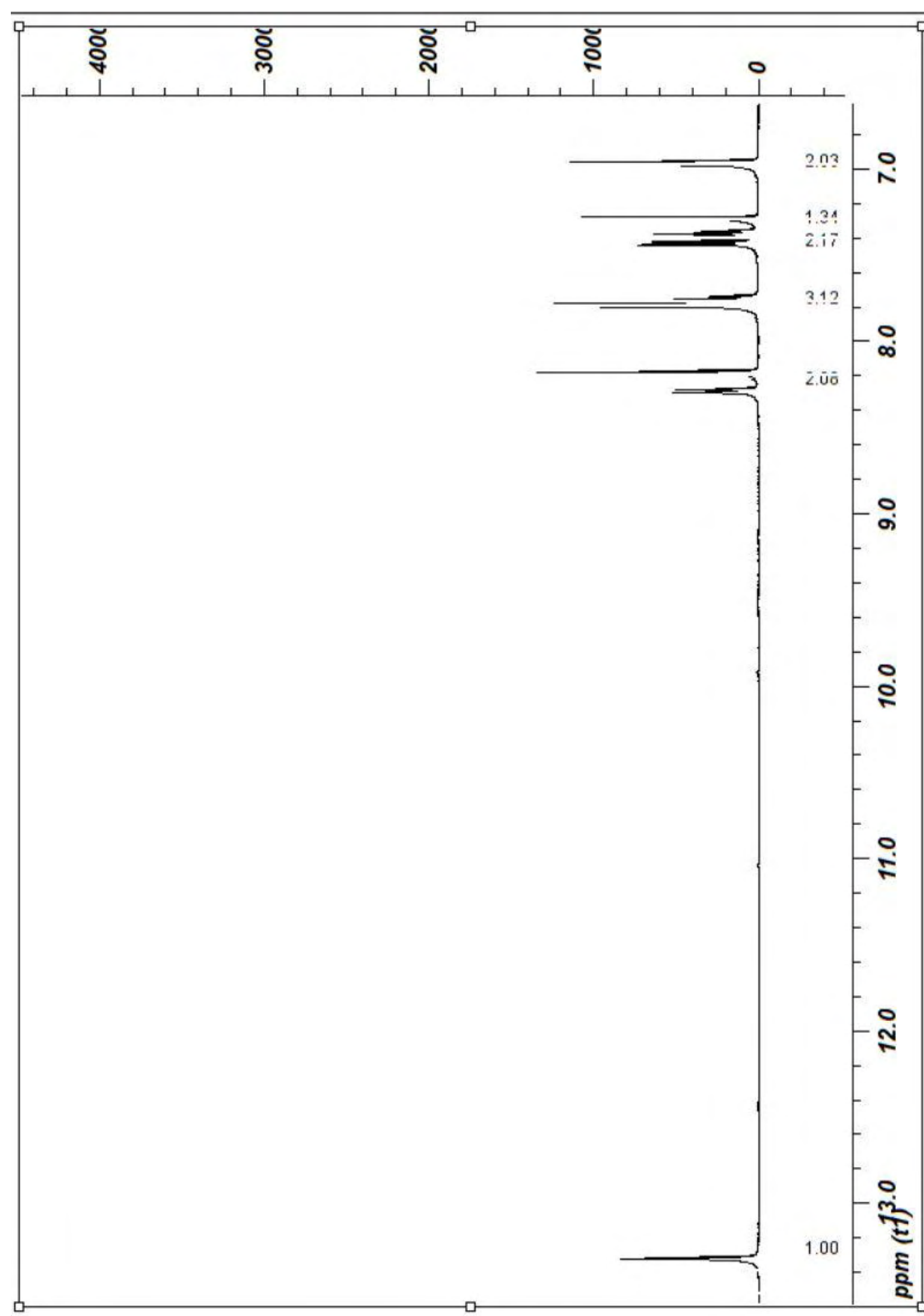
Πειραματική Πορεία του (9c)

Σε στεγνή σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκε 1 ισοδύναμο ($n=0,10\text{mmol}$, $m=23\text{mg}$, $\text{Mr}=233,22$) του (8) και προστέθηκε ο διαλύτης: άνυδρο DMF ($V=1\text{ml}$) υπό ρεύμα αζώτου και 1-2 σταγόνες φωσφορικού οξέος (H_3PO_4 85%) ως καταλύτης. Χρησιμοποιήθηκαν 1,5 ισοδύναμα ($n=0,15\text{mmol}$, $m=20,4\text{mg}$, $d=1,119 \text{ gr/ml}$, $V=18,23\text{ml}$, $\text{Mr}=136,15$) της p-ανισαλδεϋδης (4-μεθοξυβενζαλδεϋδη). Το μίγμα τοποθετήθηκε σε ελαιόλουτρο στους 110°C όπου στα πρώτα 10min σχηματίστηκε σχεδόν ακαριαία στερεό και στη συνέχεια το διάλυμα διαύγασε και η αντίδραση διήρκεσε 5-6h. Η παραλαβή του στερεού προϊόντος (9c) έγινε με διήθηση σε ηθμό με τη χρήση υδραντλίας κενού και έγιναν πλύσεις αυτού με DMF και Et_2O .

Πίνακας 13: Χαρακτηριστικά του (9c)

Μοριακό Βάρος (Mr)	336,33
Σημείο Τήξεως (Tm)	$>320^\circ\text{C}$
TLC: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (19,8:0,2)	Rf:0,6
Απόδοση	76%

Φάσμα ^1H -NMR του (9c)



4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η συνθετική πορεία για τα μη υποκατεστημένα στο N της κινολίνης παράγωγα αποτελείται από 5 στάδια. Στα τέσσερα πρώτα στάδια (τα οποία είναι γνωστά στη βιβλιογραφία) οι σχηματιζόμενες ενώσεις ήταν σχετικά διαλυτές, με σημεία τήξεως μεταξύ 150-200°C. Στο τελευταίο στάδιο, το οποίο περιλαμβάνει την προσθήκη διαφόρων υποκατεστημένων βενζαλδεϋδών στο οξο-κινολινο-καρβοϋδραζίδιο, αντιμετωπίσαμε διαφόρων ειδών προβλήματα. Χρησιμοποιήθηκαν πολλές μόνο- και δι- υποκατεστημένες βενζαλδεϋδες οι οποίες είχαν υποκαταστάτες τόσο δότες όσο και δέκτες ηλεκτρονίων. Τα τελικά προϊόντα ήταν όλα δυσδιάλυτα σε κοινούς διαλύτες και συνεπώς ήταν αδύνατο να καθαριστούν με τη χρήση χρωματογραφίας στήλης ή ανακρυστάλλωση. Όλα τα προϊόντα βρίσκονται σε στερεή φάση ως λευκή λεπτόκοκκη σκόνη ενώ τα σημεία τήξεως αυτών βρίσκονται πάνω από τους 320°C. Λόγω της δυσδιαλυτότητας των ενώσεων αυτών, πολλά από τα νεοσυντιθέμενα δείγματα δεν ήταν διαλυτά ακόμη και σε DMSO, συνεπώς δεν ήταν δυνατή και η φασματοσκοπική μελέτη με NMR. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα παράγωγα με μονο- και δι- υποκατεστημένο το βενζολικό δακτύλιο με χλώριο το οποίο έλκει ηλεκτρόνια (όπως και το φθόριο που έχουν τα επιλεγμένα τελικά προϊόντα). Τα παράγωγα αυτά ήταν τόσο δυσδιάλυτα που δεν ήταν εφικτή η λήψη φάσματος NMR άρα πιθανά και αδύνατη η βιολογική αποτίμηση. Από το σύνολο των τελικών νεοσυντιθέμενων παραγώγων επιλέχθηκαν τόσο παράγωγα με υποκαταστάτες-έλκτες ηλεκτρονίων (όπως τα N'-3-φθόρο- (4a) και N'-4-φθοροβενζυλιδενο-4-υδρόξυ-2-οξο-1,2-διϋδροκινολινο-3-καρβοϋδραζίδιο (4b)), όσο και με υποκαταστάτες-δότες ηλεκτρονίων (όπως το N'-(4-μεθοξυβενζυλιδενο)-4-υδρόξυ-2-οξο-1,2-διϋδροκινολινο-3-καρβοϋδραζίδιο (4c)). Τα προαναφερθέντα μόρια έδειξαν να είναι καθαρά κατά τη φασματοσκοπική μελέτη.

Η συνθετική πορεία για τα υποκατεστημένα στο N παράγωγα της κινολίνης αποτελείται, επίσης, από 5 στάδια τα οποία δεν διαφέρουν πολύ ως προς τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν, με αυτά των μη υποκατεστημένων στο N παράγωγα κινολίνης. Αυτή η μέθοδος πλεονεκτεί σε σχέση με την προηγούμενη καθώς το πρώτο και το δεύτερο στάδιο της συνθετικής πορείας πραγματοποιήθηκε σε μία αντίδραση. Επίσης, όλα τα προϊόντα των παραπάνω σταδίων ήταν ευδιάλυτα σε κοινούς διαλύτες όπως το δίχλωρομεθάνιο (CH_2Cl_2), συνεπώς καθарίστηκαν εύκολα με χρήση χρωματογραφίας στήλης υψηλής απόδοσης. Όλα τα τελικά προϊόντα είχαν

σημεία τήξεως άνω των 320°C και μεσαία έως υψηλή διαλυτότητα σε διχλωρομεθάνιο. Τα αντίστοιχα παράγωγα με χλώρο-υποκατεστημένη την βενζαλδεΰδη που χρησιμοποιήθηκε ,παρόλο που ήταν ευδιάλυτα, ήταν χαμηλής καθαρότητας όπως φάνηκε από τη φασματοσκοπική μελέτη που έγινε. Ωστόσο τα παράγωγα που προέκυψαν από την προσθήκη της 3- και 4-φθοροβενζαλδεΰδης, στο τελευταίο στάδιο, έδωσαν καθαρά φάσματα χωρίς προσμίξεις, παρόλο που οι αντίστοιχοι χρόνοι παραμονής της αντίδρασης ήταν αρκετά υψηλοί και ο έλεγχος με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας έδινε ασαφή εικόνα.

Αξίζει να σημειωθεί ότι και στις δύο συνθετικές πορείες οι αποδόσεις των αντιδράσεων στα 4 πρώτα στάδια ήταν αρκετά υψηλές, ενώ στο 5^ο και τελευταίο στάδιο όλα τα τελικά προϊόντα είχαν μέτριες αποδόσεις. Τέλος , έγινε επιλογή τελικών προϊόντων, από το σύνολο των παραγώγων που συντέθηκαν, βάσει της καθαρότητας, που επιβεβαιώθηκε με φασματοσκοπικά δεδομένα, αλλά και της ομοιότητας τους στο βενζυλίδενο- μέρος τους.

Από τα φάσματα NMR διαπιστώθηκε ότι η στερεοχημεία του διπλού δεσμού άνθρακα-αζώτου, στα τελικά προϊόντα, ήταν (E) όπως και αναμενόταν καθώς είναι το θερμοδυναμικά σταθερότερο ισομερές. Τα τελικά παράγωγα στάλθηκαν για βιολογική αποτίμηση στο ινστιτούτο REGA στο Βέλγιο για να διερευνηθεί η πιθανή αντική τους δράση.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] D. Rogolino, M. Carcelli, M. Sechi, N. Neamati. Viral enzymes containing magnesium: Metal binding as a successful strategy in drug design. *Coordination Chem. Rev.* **2012**, 256, 3063-3086.
- [2] S. Kumar, S. Bawa, H. Gupta. Biological Activities of Quinoline Derivatives. *Mini-Rev. in Med. Chem.* **2009**, 9, 1648-1654.
- [3] J. M. Beale Jr., J. H. Block. *Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, 12th ed. Lippincott Williams & Wilkins **2011**, pp. 245-250.
- [4] G. M. Coppola, A. D. Kahle, J. M. Shapiro. ^{13}C NMR investigation of some hetero-ring substituted 2- and 4-quinolone systems. *Org. Magn. Res.* **1981**, 17, 242-245.
- [5] L. A. Mitscher. Bacterial Topoisomerase Inhibitors: Quinolone and Pyridone Antibacterial Agents. *Chem. Rev.* **2005**, 105, 559-592.
- [6] I. Turel. The interactions of metal ions with quinolone antibacterial agents. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, 232, 27-47.
- [7] A. Serafin, A. Stańczak. The Complexes of Metal Ions with Fluoroquinolones. *Russ. J. Coord. Chem.* **2009**, 35, 81-95.
- [8] α) C. Sissi, M. Andreoli, V. Cecchetti, A. Fravolini, B. Gatto, M. Palumbo. Mg^{2+} -Mediated Binding of 6-Substituted Quinolones to DNA: Relevance to Biological Activity. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, 6, 1555-1561. β) C. G. Noble, F. M. Barnard, A. Maxwell. Quinolone-DNA Interaction: Sequence-Dependent Binding to Single-Stranded DNA Reflects the Interaction within the Gyrase-DNA Complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, 47, 854-862.
- [9] A. Wohlkonig, P. F. Chan, A. P. Fosberry, P. Homes, J. Huang, M. Kranz, V. R. Leydon, T. J. Miles, N. D. Pearson, R. L. Perera, A. J. Shillings, M. N. Gwynn, B. D. Bax. Structural basis of quinolone inhibition of type IIA topoisomerases and target-mediated resistance. *Nature Struct. Mol. Biol.* **2010**, 17, 1152-1153.

- [10] M. L. Barreca, N. Iraci, L. De Luca, A. Chimi. Induced-Fit Docking Approach Provides Insight into the Binding Mode and Mechanism of Action of HIV-1 Integrase Inhibitors. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 1446-1456.
- [11] J. K. Pratt, P. Donner, K. F. McDaniel, C. J. Maring, W. M. Kati, H. Mo, T. Middleton, Y. Liu, T. Ng, Q. Xie, R. Zhang, D. Montgomery, A. Molla, D. J. Kempf, W. Kohlbrenner. Inhibitors of HCV NS5B polymerase: synthesis and structure–activity relationships of N-1-heteroalkyl-4-hydroxyquinolon-3-yl-benzothiadiazines. *Bioor. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 1577-1582.
- [12] M. Varrin-Doyer, S. S. Zamvil, U. Schulze-Topphoff. Laquinimod, an up-and-coming immunomodulatory agent for treatment of multiple sclerosis. *Exp. Neurol.* **2014**, *262*, 66-71.
- [13] G. Athanasellis, E. Gavrielatos, O. Igglessi-Markopoulou, J. Markopoulos. Novel 'quinolone' metal complexes: Synthesis and spectroscopic studies of Mg(II), Zn(II) and Ba(II) complexes with N-methyl (or NH)-3-acetyl-4-hydroxy quinolin-2-one ligands. *J. Heterocyclic Chem.* **2003**, *40*, 645-648.
- [14] S. Rollas, Ş. G. Küçükgülzel. Biological Activities of Hydrazone Derivatives. *Molecules* **2007**, *12*, 1910-1939.
- [15] R. Narang, B. Narasimhan, S. Sharma. A Review on Biological Activities and Chemical Synthesis of Hydrazone Derivatives. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 569-612.
- [16] (α) S. Thota, D. A. Rodrigues, P. S. M. Pinheiro, L. M. Lima, C. A.M. Fraga, E. J. Barreiro. N-Acylhydrazones as drugs. *Bioor. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28*, 2797-2806. (β) C. A. M. Fraga, E. J. Barreiro. Medicinal Chemistry of N-Acylhydrazones: New Lead-Compounds of Analgesic, Antiinflammatory and Antithrombotic Drugs. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 167-198.
- [17] M. Sugiura, S. Kobayashi. N-Acylhydrazones as Versatile Electrophiles for the Synthesis of Nitrogen-Containing Compounds. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5176-5186.
- [18] G. Vantomme and J.-M. Lehn. Photo- and Thermoresponsive Supramolecular Assemblies: Reversible Photorelease of K⁺ Ions and Constitutional Dynamics. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 3940-3943.

- [19] L. Popiolek. Hydrazide–hydrazones as potential antimicrobial agents: overview of the literature since 2010. *Med. Chem. Res.* **2017**, *26*, 287-301.
- [20] Blass, Benjamin. *Basic Principles of Drug Discovery and Development*. Elsevier **2015**. p. 511.
- [21] P. Melnyk, V. Leroux, C. Sergheraert, P. Grellier. Design, synthesis and in vitro antimalarial activity of an acylhydrazone library. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 31-35.
- [22] L. W. Zheng, L. L. Wu, B. X. Zhao, W. L. Dong, J. Y. Miao. Synthesis of novel substituted pyrazole-5-carbohydrazide hydrazone derivatives and discovery of a potent apoptosis inducer in A549 lung cancer cells. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1957-1962.
- [23] B. Tian, M. He, Z. Tan, S. Tang, I. Hewlet, S. Chen, Y. Jin, M. Yang. Synthesis and Antiviral Evaluation of New N-acylhydrazones Containing Glycine Residue. *Chem. Biol. Drug. Des.* **2011**; *77*, 189-198.
- [24] B.-K. Kim, H. Ko, E.-S. Jeon, E.-S. Ju, L. S. Jeong, Y.-C. Kim. 2,3,4-Trihydroxybenzyl-hydrazide analogues as novel potent coxsackievirus B3 3C protease inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *120*, 202-216.
- [25] M. Carcelli, D. Rogolino, A. Gatti, L. De Luca, M. Sechi, G. Kumar, S. W. White, A. Stevaert, L. Naesens. N-acylhydrazone inhibitors of influenza virus PA endonuclease with versatile metal binding modes. *Sci Rep.* **2016**, *6*, 31500.
- [26] D. Rogolino, M. Carcelli, A. Bacchi, C. Compari, L. Contardi, E. Fiscaro, A. Gatti, M. Sechi, A. Stevaert, L. Naesens. A versatile salicyl hydrazonic ligand and its metal complexes as antiviral agents. *J. Inorg. Biochem.* **2015**, *150*, 9-17.
- [27] N. Sluis-Cremer, D. Arion, M. A. Parniak. Destabilization of the HIV-1 Reverse Transcriptase Dimer upon Interaction with N-Acyl Hydrazone Inhibitors. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *62*, 398-405.
- [28] G. Borkow, R. S. Fletcher, J. Barnard, D. Arion, D. Motakis, G. I. Dmitrienko, M. A. Parniak. Inhibition of the Ribonuclease H and DNA Polymerase Activities of HIV-1 Reverse Transcriptase by N-(4-tert-Butylbenzoyl)-2-hydroxy-1-naphthaldehyde Hydrazone. *Biochemistry* **1997**, *36*, 3179-3185.

- [29] A. Herschhorn, C. Gu, N. Espy, J. Richard, A. Finzi, J. G. Sodroski. A broad HIV-1 inhibitor blocks envelope glycoprotein transitions critical for entry. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 845-852.
- [30] B. Tian, M. He, S. Tang, I. Hewlett, Z. Tan, J. Li, Y. Jin, M. Yang. Synthesis and antiviral activities of novel acylhydrazone derivatives targeting HIV-1 capsid protein. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 2162-2167.
- [31] T. W. Sanchez, B. Debnath, F. Christ, H. Otake, Z. Debyser, N. Neamati. Discovery of novel inhibitors of LEDGF/p75-IN protein–protein interactions. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 957-963.